



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

*“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y MECÁNICA DE HIDROGELES A  
BASE DE QUITOSANO Y POLI(ALCOHOL VINÍLICO) PARA APLICACIONES  
BIOMÉDICAS”*

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA :  
**ING. ITZEL MARISOL GARNICA PALAFOX**

TUTOR  
DR. FRANCISCO MANUEL SÁNCHEZ ARÉVALO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR  
DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

DRA. ZAIRA YUNUÉN GARCÍA CARVAJAL  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada

Secretario: Dra. Laura Oropeza Ramos

1<sup>er</sup> Vocal: Dra. María Cristina Velasquillo Martínez

2<sup>do</sup> Vocal: Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo

3<sup>er</sup> Vocal: Dr. José Ocotlán Flores Flores

Lugar donde se realizó la tesis:

Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM)

Instituto Nacional De Rehabilitación (INR)

## **TUTOR DE TESIS**

*Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo*

*Trabaja duro, hasta el día en el que  
a tu firma la llamen “Autógrafo”.*

Anónimo

## DEDICATORIA

*A la persona más importante en mi vida, mi ejemplo a seguir, mi heroína, mi guía, mi sostén y mi confidente, mi mamá, **Ma. Asunción Palafox**. Por su amor incondicional, por hacer de mí una persona íntegra, por ser mi más grande apoyo y por confiar en mí siempre. Gracias por estar en todo momento a mi lado compartiendo mis alegrías, tristezas, triunfos y tropiezos, por alimentar mis sueños y por impulsarme en todo momento a cumplirlos.*

*A mi papá, **José Garnica**, por su apoyo, por inculcarme hábitos y por guiarme bajo la premisa que toda disciplina tiene su recompensa.*

*A mis hermanos **Diego y Alberto**, por poner a prueba mi paciencia, por desarrollar mis habilidades luchísticas, por su lealtad, por cuidar de mí en todo momento, por ser mis cómplices y por compartir conmigo sus logros y alegrías.*

*A mis abuelitos **Elvira Murguía y Rubén Palafox**<sup>†</sup>, por enseñarme a brindar a los demás una ayuda desinteresada y sobre todo por ser mi más grande ejemplo de honestidad y generosidad.*

*A mi tía **Xóchitl Palafox**, mi segunda madre, por el infinito amor que nos tiene a mí y a mis hermanos. Gracias por cuidarnos desde siempre, por tus enseñanzas, por compartir tu vida con nosotros y por estar en todo momento a nuestro lado apoyándonos incondicionalmente.*

*Gracias, sin todos ustedes no lo hubiese podido lograr.*

*Los amo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme una educación de calidad y excelencia.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales por darme la oportunidad de avanzar en mi formación académica dentro de sus aulas y laboratorios.

De manera muy especial a mi asesor, el Dr. Francisco Sánchez Arévalo, quien me brindó sus conocimientos, apoyo, confianza y guía durante estos años, impulsándome en todo momento para lograr este objetivo. ¡Mil gracias por todo!.

A mi asesora, la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez, por acogerme en su equipo de trabajo y abrirme las puertas de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC y MR) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), lugar en donde se llevaron a cabo las pruebas biológicas aquí presentadas.

A la Dra. Zaira Yunuén García Carbajal, miembro de mi comité tutorial, por asesorarme e instruirme en la síntesis de las membranas empleadas y por estar al pendiente de mis avances en el proyecto de investigación durante estos dos años.

Al Biol. Valentín Martínez del INR por su tiempo y disposición para enseñarme las técnicas básicas de cultivo celular. A la Biol. Carmina Ortega y a la Biol. Julieta García por su ayuda y experiencia en el desarrollo de las pruebas de MTT.

Al Dr. Alfredo Maciel y al Dr. Ricardo Vera por abrirme las puertas de su laboratorio y facilitarme en todo momento los equipos que necesité.

A los técnicos del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) que participaron con la operación de equipo para el análisis y caracterización de las muestras: a la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino por lo estudios de análisis térmico, a la M. en C. Adriana Tejada Cruz por los estudios de rayos X, al Ing. Gerardo Cedillo por los estudios de  $^1\text{H}$  RMN y por su

contribución en el análisis de los resultados y finalmente al Quim. Miguel Ángel Canseco por los estudios de FTIR.

A la M. en C. Lilia Solís del INR por su ayuda con la operación del equipo de ESEM para el análisis de las membranas y los constructos obtenidos.

Al Ing. Fernando Molina y al Sr. Miguel Díaz por su apoyo en el maquinado de piezas en control numérico.

A la Lic. Tere Vázquez y la Lic. Oralia L. Jiménez por su apoyo en la búsqueda bibliográfica.

A CONACYT y DGEP por las becas otorgadas durante la realización de mis estudios de maestría.

Al proyecto PAPIIT IB100512 e IB100512-RR180512, así como al proyecto CONACYT Sectoriales 114359, por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Sandra Rodil, la Dra. Laura Oropeza, el Dr. José Ocotlán Flores, la Dra. Ma. Cristina Velasquillo y el Dr. Francisco Sánchez, por todas sus aportaciones, tiempo, paciencia y consejos para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Celso Briones y Daniel Flores por hacer más amenas las horas de trabajo y compartir la frustración cuando el programa en LabView de alguno extrañamente dejaba de funcionar.

A los miembros del laboratorio de Nanofibras para Ingeniería de Tejidos del IIM, Alida Ospina, Andrómeda Monroy, Aurora Navarro, Rodolfo Aragón, Selene Alcántara y Ulises Espinoza por acogerme en su laboratorio, por ayudarme a disipar las dudas que en su momento surgieron y sobre todo por brindarme su amistad y confianza.



## ÍNDICE GENERAL

<b>JURADO ASIGNADO</b> -----	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA</b> -----	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> -----	<b>V</b>
<b>LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS</b> -----	<b>XIV</b>
<b>LISTADO DE SIMBOLOS</b> -----	<b>XV</b>
<b>RESUMEN</b> -----	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>XIX</b>
<b>OBJETIVOS</b> -----	<b>XXII</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> -----	<b>1</b>
1.1. EL OÍDO EXTERNO -----	1
1.2. MALFORMACIONES DEL OÍDO EXTERNO -----	3
1.2.1. <i>Tratamiento</i> -----	4
1.2.1.1. Reconstrucción quirúrgica -----	4
1.2.1.2. Implantes aloplásticos -----	5
1.2.1.3. Ingeniería de Tejidos -----	5
1.3. HIDROGELES -----	7
1.3.1. <i>Clasificación</i> -----	8
1.3.1.1. Por el tipo de entrecruzamiento -----	8
1.3.1.2. Por el origen de los polímeros -----	9
1.4. QUITOSANO -----	11
1.5. POLI(ALCOHOL VINÍLICO) -----	13
1.6. EPICLORHIDRINA -----	14
1.7. ESTADO DEL ARTE -----	15
1.7.1. <i>Andamios usados en la regeneración auricular</i> -----	15
1.7.2. <i>Mezcla CS/PVA</i> -----	19
<b>2. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b> -----	<b>23</b>
2.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES -----	23
2.1.1 <i>Disolución de CS (2.5% p/v)</i> -----	23

2.1.2	<i>Disolución de PVA (7.8% p/v)</i>	24
2.1.3	<i>Mezcla CS/PVA y entrecruzamiento químico</i>	24
2.1.4	<i>Esterilización de las membranas de CS/PVA/ECH</i>	25
2.2	PRUEBAS DE HINCHAMIENTO	26
2.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	28
2.3.1	<i>Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	29
2.3.2	<i>Resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H RMN)</i>	30
2.3.3	<i>Difracción de rayos X (DRX)</i>	33
2.4	DESARROLLO DE LA TEORÍA ELÁSTICA DE LOS ELASTÓMEROS	35
2.5	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA Y ESTRUCTURAL	43
2.5.1	<i>Pruebas de tensión uniaxial</i>	44
2.5.1.1	Preparación de las muestras	44
2.5.1.2	Equipo y análisis mecánico	45
2.5.2	<i>Propiedades Estructurales</i>	47
2.6	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	49
2.6.1	<i>Aislamiento y cultivo in vitro de condrocitos auriculares</i>	49
2.6.2	<i>Formación de constructos</i>	51
2.6.3	<i>Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental</i>	52
2.6.4	<i>Prueba de viabilidad celular</i>	52
2.6.5	<i>Prueba de citotoxicidad</i>	53
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
3.1	REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO Y SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	55
3.2	PRUEBAS DE HINCHAMIENTO	62
3.3	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	66
3.4	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES ( <sup>1</sup> H RMN)	69
3.5	DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)	71
3.6	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	76
3.7	PROPIEDADES ESTRUCTURALES	81
3.8	ADHESIÓN Y VIABILIDAD CELULAR SOBRE LOS ANDAMIOS	86
3.9	PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	89
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1: ESTRUCTURA DEL ÓRGANO VESTÍBULOCOCLEAR. ADAPTADA DE [39].....	1
FIGURA 1.2: ESQUEMA CON LAS PARTES DEL PABELLÓN AURICULAR. [41] .....	2
FIGURA 1.3: MALFORMACIONES DEL PABELLÓN AURICULAR: A) ANOTIA Y B) MICROTIA. [44] .....	3
FIGURA 1.4: RECONSTRUCCIÓN AURICULAR MEDIANTE EL USO DE CARTÍLAGO COSTAL. [50].....	4
FIGURA 1.5: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RED POLIMÉRICA DE UN HIDROGEL: A) QUÍMICAMENTE ENTRECruzADO, B) FÍSICAMENTE ENTRECruzADO. [59] .....	9
FIGURA 1.6: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA UNIDAD REPETIDA DE A) LA QUITINA Y B) EL QUITOSANO. [65] .....	11
FIGURA 1.7: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA UNIDAD REPETIDA DEL QUITOSANO PARCIALMENTE DESACETILADO. [65] .....	11
FIGURA 1.8: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA UNIDAD REPETIDA DE POLI(ALCOHOL VINÍLICO). [69] .....	13
FIGURA 1.9: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MOLÉCULA DE EPICLORHIDRINA (ECH). [74].....	14
FIGURA 2.1: PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE CS/PVA/ECH MEDIANTE IRRADIACIÓN UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). .....	26
FIGURA 2.2: DESARROLLO DE LA PRUEBA DE HINCHAMIENTO, A) MUESTRAS DE HIDROGEL DE 10 mm <sup>2</sup> , B) PESAJE DE LAS MUESTRAS SECAS, C) INMERSIÓN EN PBS A 37 °C Y PH 7.4, D) ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN UN BAÑO DE AGUA A 37 °C, E) A DETERMINADOS INTERVALOS DE TIEMPO LAS MUESTRAS SE RETIRAN DEL FRASCO CON PBS Y EL LÍQUIDO SUPERFICIAL SE LIMPIA CON PAPEL FILTRO, F) PESAJE DE LAS MUESTRAS TRAS EL PERIODO DE HINCHAMIENTO. ....	28
FIGURA 2.3: COMPONENTES DEL ESPECTRÓMETRO DE RMN EMPLEADO EN ESTE ESTUDIO. ....	31
FIGURA 2.4: NIVELES DE ENERGÍA DE LOS NÚCLEOS BAJO LA ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO ( $B_0$ ). MODIFICADA DE [98] .....	32
FIGURA 2.5: ESQUEMA QUE DESCRIBE EL FENÓMENO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	33
FIGURA 2.6: DIFRACTÓMETRO D8 ADVANCE (BRUKER) EMPLEADO DURANTE LAS PRUEBAS. ....	34
FIGURA 2.7: EQUIPO PARA PRUEBAS DE TENSIÓN UNIAXIAL. A) COMPONENTES DEL DISPOSITIVO DE CARGA UNIAXIAL, B) MORDAZAS EMPLEADAS LA SUJECIÓN DE MUESTRAS SUAVES.....	46
FIGURA 2.8: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA RED POLIMÉRICA DE LOS HIDROGELES .....	47
FIGURA 2.9: HIDRODISECCIÓN DEL CARTÍLAGO AURICULAR DE CONEJO. A) INYECCIÓN DE LA DISOLUCIÓN SALINA PARA SEPARAR LA PIEL DEL CARTÍLAGO, B) LA PIEL SE RETIRA CON LA AYUDA DE UNAS PINZAS DE DISECCIÓN C) EL PERICONDRIO REMANENTE SE ELIMINA CUIDADOSAMENTE DEL CARTÍLAGO CON UN BISTURÍ, D) CARTÍLAGO ELÁSTICO AURICULAR LIMPIO Y LISTO PARA SU DIGESTIÓN MECÁNICA Y ENZIMÁTICA.....	50

FIGURA 3.1: MECANISMO DE LA REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO ENTRE LAS CADENAS DE QUITOSANO (CS) Y LA EPICLORHIDRINA (ECH) A TRAVÉS DE LAS AMINAS PRIMARIAS (-NH <sub>2</sub> ) DEL CS. ....	57
FIGURA 3.2: MECANISMO DE LA REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO ENTRE LAS CADENAS DE QUITOSANO (CS) Y LA EPICLORHIDRINA (ECH) A TRAVÉS DE LOS GRUPOS HIDROXILO (-OH) DEL CS. ....	58
FIGURA 3.3: MECANISMO DE LA REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO ENTRE LAS CADENAS LA EPICLORHIDRINA (ECH) Y EL DE POLI(ALCOHOL VINÍLICO) (PVA) A TRAVÉS DE SUS GRUPOS HIDROXILO (-OH). ....	59
FIGURA 3.4: ESTRUCTURA MOLECULAR PROPUESTA PARA LA RED POLIMÉRICA DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH. EN ELLA SE CONSIDERAN TODAS LAS INTERACCIONES MOLECULARES QUE SE PUEDEN PRESENTAR DURANTE EL ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO DE LA MEZCLA CS/PVA CON ECH: A) UNIÓN DE CS POR SUS GRUPOS -NH <sub>2</sub> (RECUADRO AZUL), B) UNIÓN DE CS POR GRUPOS -OH (RECUADRO VERDE), C) ENLACES DE PVA-PVA POR SUS GRUPOS -OH (RECUADRO MORADO), D) UNIÓN CS-PVA MEDIANTE SUS RESPECTIVOS GRUPOS -OH (RECUADRO ROJO), Y FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO INTER E INTRAMOLECULARES (LÍNEAS PUNTEADAS). ....	61
FIGURA 3.5: FOTOGRAFÍA DE UNA DE LAS MEMBRANAS SINTETIZADAS DE CS/PVS/ECH. ....	62
FIGURA 3.6: COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV. A) CURVA DE ABSORCIÓN DE LÍQUIDO DE LOS HIDROGELES DE CH/PVA/ECH (PUNTOS) Y CS/PVA/ECH UV (CUADROS). EN EL RECUADRO INTERNO SE MUESTRA A DETALLE LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE AMBOS GRUPOS DE MUESTRAS DURANTE LAS PRIMERAS TRES HORAS DE HINCHAMIENTO. B) CAMBIO DE PH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE LA DISOLUCIÓN DE PBS EN LA QUE SE COLOCARON LOS HIDROGELES. EN LA GRÁFICA PRINCIPAL SE APRECIA EL CAMBIO DE PH DURANTE LAS PRIMERAS TRES HORAS DE HINCHAMIENTO, MIENTRAS QUE EN EL RECUADRO, SE ENCUENTRA GRAFICADO EL PH DE LA DISOLUCIÓN DE PBS DURANTE TODA LA PRUEBA (50 HORAS). ....	63
FIGURA 3.7: ESPECTROS DE FTIR DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES DE LAS MEMBRANAS DE CS/PVA/ECH: PVA (AMARILLO), CS (MAGENTA) Y ECH (AZUL). ....	66
FIGURA 3.8: ESPECTROS DE FTIR DE LAS MEZCLAS POLIMÉRICAS: CS/PVA (AZUL), CS/PVA/ECH (MAGENTA) Y CS/PVA/ECH UV (AMARILLO). ....	67
FIGURA 3.9: ESPECTROS DE <sup>1</sup> H RMN DE LA ECH (NEGRO) Y EL AGUA EMPLEADA EN EL PRIMER Y ÚLTIMO LAVADO DE LOS HIDROGELES (ROJO Y AZUL, RESPECTIVAMENTE). ....	70
FIGURA 3.10: AMPLIACIÓN DE LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE 2.20-1.85 δ (PPM) DEL ESPECTRO DE <sup>1</sup> H RMN DEL AGUA UTILIZADA EN EL PRIMER LAVADO DE LOS HIDROGELES. LA AUSENCIA DE ECH ES CONFIRMADA. ....	71
FIGURA 3.11: DIFRACTOGRAMAS DE LAS MEMBRANAS CS (MAGENTA), PVA (AZUL MARINO), CS/PVA (AMARILLO), CS/PVA/ECH (VERDE) Y CS/PVA/ECH UV (AZUL CIELO). ....	74
FIGURA 3.12: CURVAS DE ESFUERZO COMO FUNCIÓN DE LA RAZÓN DE ELONGACIÓN DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV. AMBOS GRUPOS DE MUESTRAS PRESENTAN UN COMPORTAMIENTO NO LINEAL. ....	77
FIGURA 3.13: GRÁFICA COMPARATIVA DE LOS MÓDULOS ELÁSTICOS DE HIDROGELES DE CS <sup>[133]</sup> , PVA <sup>[132]</sup> , CS/PVA <sup>[24, 25, 31]</sup> , CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV. ....	78

FIGURA 3.14:  $M_{CR.L}$  COMO FUNCIÓN DE  $D_N$  PARA LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV. LOS CUADROS MAGENTA REPRESENTAN A LAS MUESTRAS DE CS/PVA/ECH UV Y LOS CÍRCULOS AZUL REY A LAS DE CS/PVA/ECH. EL CUADRO ROSA Y EL CÍRCULO AZUL CIELO CON LAS BARRAS DE ERROR CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE LAS MUESTRAS DE CS/PVA/ECH UV Y CS/PVA/ECH, RESPECTIVAMENTE. TODAS LAS MUESTRAS SIGUEN UNA TENDENCIA EXPONENCIAL Y SU PROMEDIO CAE DENTRO DEL AJUSTE REALIZADO..... 83

FIGURA 3.15: MÓDULO ELÁSTICO COMO FUNCIÓN DEL PESO MOLECULAR ENTRE PUNTOS DE ENTRECruzAMIENTO ( $M_{CR.L}$ ) DE LAS MUESTRAS DE CS/PVA/ECH (PUNTOS AZUL REY) Y CS/PVA/ECH UV (CUADROS MAGENTA). PARA AMBOS HIDROGELES, CONFORME EL  $M_{CR.L}$  INCREMENTA, EL MÓDULO ELÁSTICO DISMINUYE EXPONENCIALMENTE. EL CUADRO ROSA Y EL CÍRCULO AZUL CIELO CON LAS BARRAS DE ERROR CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE LAS MUESTRAS DE CS/PVA/ECH UV Y CS/PVA/ECH, RESPECTIVAMENTE. EL PROMEDIO DE LAS MUESTRAS ENSAYADAS CAE DENTRO DEL AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES. .... 84

FIGURA 3.16: MÓDULO ELÁSTICO COMO FUNCIÓN DEL TAMAÑO DE MALLA ( $D_N$ ) DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH (PUNTOS AZUL REY) Y CS/PVA/ECH UV (CUADROS MAGENTA). CONFORME EL  $D_N$  INCREMENTA, EL MÓDULO ELÁSTICO DISMINUYE EXPONENCIALMENTE. EL CUADRO ROSA Y EL CÍRCULO AZUL CIELO CON LAS BARRAS DE ERROR CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE LAS MUESTRAS DE CS/PVA/ECH UV Y CS/PVA/ECH, RESPECTIVAMENTE..... 85

FIGURA 3.17: SUPERFICIE DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH UV TRAS 10 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. A) SUPERFICIE DEL HIDROGEL DE CS/PVA/ECH UV SIN CÉLULAS (MUESTRA DE CONTROL). B) DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS SOBRE LA SUPERFICIE DEL HIDROGEL. C) CONDROCITOS ADHERIDOS AL ANDAMIO CELULAR Y ORGANIZADOS EN GRUPOS ISÓGENOS. D) CONDROCITOS ADHERIDOS AL HIDROGEL Y EMBEBIDOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) SINTETIZADA POR ELLOS MISMOS. .... 87

FIGURA 3.18: MICROGRAFÍA FLUORESCENTE DE LOS CONSTRUCTOS SOMETIDOS A LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE CALCEÍNA-AM Y HOMODÍMERO DE ETÍDIO TRAS 10 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. SE OBSERVAN EN VERDE LOS CONDROCITOS AURICULARES VIVOS Y EN ROJO LOS MUERTOS. ALREDEDOR DEL >99% DE LAS CÉLULAS SOBRE EL HIDROGEL DE CS/PVA/ECH UV SE ENCUENTRAN VIVAS. .... 89

FIGURA 3.19: ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DURANTE LOS PRIMEROS 10 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. EN ESTA FIGURA LAS BARRAS AZULES REPRESENTAN A LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH UV SIN CÉLULAS (CONTROL NEGATIVO); LAS BARRAS AMARILLAS A LOS CONDROCITOS SOBRE LAS CAJAS DE POLIESTIRENO (CONTROL POSITIVO) Y LAS BARRAS VERDES CORRESPONDEN A LOS CONSTRUCTOS FORMADOS CON MEMBRANAS DE CS/PVA/ECH UV Y CONDROCITOS. .... 90

FIGURA 3.20: CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO RESPECTO A UN NÚMERO DE CÉLULAS CONOCIDO. LOS PUNTOS CORRESPONDEN A LOS DATOS EXPERIMENTALES Y LA LÍNEA DISCONTINUA AL AJUSTE MATEMÁTICO QUE DESCRIBE LA RELACIÓN ENTRE LA ABSORBANCIA LEÍDA Y EL NÚMERO DE CÉLULAS VIABLES..... 92

FIGURA 3.21: GRÁFICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS CONSTRUCTOS (CUADRADOS) Y DE LOS CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS (CÍRCULOS Y TRIÁNGULOS, RESPECTIVAMENTE) ENSAYADOS. ASIMISMO SE SEÑALAN LAS FASES DE LATENCIA, ACELERACIÓN Y CRECIMIENTO EXPONENCIAL QUE SIGUEN LOS CONSTRUCTOS DURANTE SU PROLIFERACIÓN (CUADRADOS)..... 93

FIGURA 3.22: VELOCIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS CONSTRUCTOS (CUADRADOS) Y DE LOS CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS (CÍRCULOS Y TRIÁNGULOS, RESPECTIVAMENTE) ENSAYADOS. LAS FASES DE PROLIFERACIÓN QUE PRESENTAN LOS CONSTRUCTOS (FASE DE LATENCIA, FASE DE ACELERACIÓN Y FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL) SON SEÑALADAS. .... 95

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE DRX PARA LAS MEMBRANAS DE PVA, CS, CS/PVA, CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV .....	75
TABLA II. RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y EL ÍNDICE DE HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO DE LAS MEMBRANAS DE CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV.....	80
TABLA III. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/ECH Y CS/PVA/ECH UV. ....	82

**LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS**

<sup>1</sup> H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protones
CS	quitosano
CS/PVA	hidrogel de quitosano y poli(alcohol vinílico)
CS/PVA/ECH	hidrogel de quitosano y poli(alcohol vinílico) entrecruzado químicamente con epíclorhidrina
CS/PVA/ECH UV	hidrogel de quitosano y poli(alcohol vinílico) entrecruzado químicamente con epíclorhidrina y radiado con luz ultravioleta como medio de esterilización
DA	unidad monomérica desacetilada del quitosano
DRX	difracción de rayos X
ECH	epíclorhidrina
ESEM	microscopía electrónica de barrido ambiental
FTIR	espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GA	glutaraldehído
GAGs	glicosaminoglicanos
MEC	matriz extracelular
MPa	megapascal (1MPa= 1x10 <sup>6</sup> kg m <sup>-1</sup> s <sup>-2</sup> )
MTT	bromuro de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazolio
OPTN	Organ Procurement Transplant Network
PBS	búfer fosfato salino con pH 7.4
PEG	polietilenglicol
PEO	poli(óxido de etileno)
PGA	poli(ácido glicólico)
PLLA	poli(ácido láctico)
PPF	poli(fumarato de propileno)
PVA	poli(alcohol vinílico)
SRTR	Scientific Registry of Transplant Recipients
UTS	esfuerzo último a la ruptura
UV	radiación ultravioleta



**LISTADO DE SIMBOLOS****LETRAS ROMANAS**

$A$	número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), energía libre de Helmholtz
$A_a$	área bajo la curva de la zona amorfa
$A_c$	área bajo la curva de los picos cristalinos
$A_T$	área transversal de la probeta
$c$	concentración del polímero en la disolución
$C$	constante
$C_r$	porcentaje de cristalinidad
$D_N$	tamaño de poro o malla
$E$	módulo elástico o módulo de Young
$f$	fuerza de tensión
$G$	módulo de corte
$l$	longitud
$l_o$	distancia inicial de la zona calibrada en la prueba de tensión
$L_i$	longitud de la red elastomérica en la dirección $i$
$M_{crl}$	peso molecular entre puntos de entrecruzamiento
$n$	número de cadenas que conforman la red elastomérica
$N$	número de cadenas por unidad de volumen
$P$	presión
$Q$	porcentaje de hinchamiento
$Q_e$	porcentaje de hinchamiento
$r$	distancia entre los extremos de una cadena polimérica ideal
$\vec{r}$	vector que describe la posición de los extremos de una cadena polimérica ideal tras su deformación
$\vec{r}_o$	vector que describe la posición de los extremos de una cadena polimérica ideal sin deformar

$\overline{r_o^2}$	distancia media cuadrática entre los extremos de una cadena real
$\overline{r_f^2}$	distancia media cuadrática entre los extremos de una cadena sin restricciones
$R$	constante universal de los gases ( $8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
$S$	entropía
$T$	temperatura
$U$	energía interna
$V$	volumen
$w_f$	peso de la muestra de hidrogel hidratada
$w_o$	peso de la muestra de hidrogel seca
$W$	trabajo aplicado al sistema por fuerzas externas
$W_t$	trabajo de deformación total de la red elastomérica

**LETRAS GRIEGAS**

$\varepsilon$	deformación longitudinal
$\kappa$	constante de Boltzman ( $1.3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )
$\lambda$	razón de elongación en tensión uniaxial
$\lambda_i$	factor de deformación en la dirección $i$ (razón de deformación)
$\nu$	coeficiente de Poisson
$\nu_s$	fracción volumétrica del polímero hidratado hasta su equilibrio
$\sigma$	esfuerzo
$\varphi_c$	densidad de entrecruzamiento teórica
$\Omega(r, T)$	probabilidad de que una cadena polimérica con distancia $r$ adopte cierta configuración a una temperatura $T$

## RESUMEN

En este trabajo de tesis se describe la síntesis y la caracterización de un hidrogel híbrido en forma de membrana delgada, hecho a base de quitosano y poli(alcohol vinílico) entrecruzado químicamente con epíclorhidrina (CS, PVA y ECH por sus siglas en inglés respectivamente) para posibles aplicaciones en el área de ingeniería de tejidos.

La respuesta mecánica de los hidrogeles se evaluó mediante pruebas de tensión uniaxial, mientras que las propiedades estructurales tales como el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{crit}$ ), el tamaño de poro o malla ( $D_N$ ) y la fracción volumétrica del polímero ( $v_s$ ) fueron determinadas a partir del módulo elástico bajo tensión uniaxial y el porcentaje de hinchamiento, en combinación con la teoría de la red polimérica afín desarrollada por Kuhn. Los hidrogeles presentaron un módulo de elasticidad de  $11.5 \pm 2$  MPa y  $9 \pm 1$  MPa. Dichos valores corresponden a membranas sometidas a radiación ultravioleta y sin radiar respectivamente.

La caracterización biológica de las membranas se llevó a cabo en la unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). El efecto citotóxico de los hidrogeles debido a la posible presencia de trazas de ECH sin reaccionar, se evaluó mediante pruebas con bromuro de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazolio, mejor conocido como MTT. La viabilidad de las células sembradas sobre los hidrogeles de CS/PVA/ECH se estudió usando calceína-AM/homodímero de etidio y mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) se determinó la adhesión celular. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de efectos citotóxicos durante los primeros días de cultivo *in vitro*, se demostró la viabilidad del 99% de las células sembradas sobre los hidrogeles y mediante ESEM se observó su adhesión a la superficie del material y la formación de matriz extracelular.

Finalmente, para descartar la presencia de ECH sin reaccionar en los hidrogeles, pequeñas muestras de las membranas se estudiaron mediante resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$  RMN) y espectroscopía infrarroja por

transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). En ambos casos, los espectrogramas no mostraron los picos característicos de la ECH. Conforme a estos resultados se demostró que tras el proceso de entrecruzamiento y síntesis de las membranas, no quedaron residuos de ECH en los hidrogeles, por lo que la posibilidad de liberación de trazas del agente entrecruzante durante el cultivo celular se descartó.

Así, los hidrogeles híbridos de CS/PVA/ECH permiten el crecimiento celular y la formación de matriz extracelular, mostrando buenas propiedades biológicas, mecánicas y estructurales para su uso potencial en ingeniería de tejidos.

## INTRODUCCIÓN

“La necesidad es real, 116839 personas están esperando un órgano y 18 de ellas morirán cada día en espera de uno” [1]. La demanda de órganos y tejidos incrementa día a día de acuerdo con las estadísticas reportadas por la Organ Procurement Transplant Network (OPTN) y la Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) [1]. A pesar de que el número de donadores ha incrementado, los receptores frecuentemente presentan ciertas complicaciones tales como infecciones o incluso el rechazo del tejido trasplantado [2]. Para tratar de reducir estos riesgos, hace unas cuantas décadas surgió un área científica multidisciplinaria denominada ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos se ha enfocado en el desarrollo de andamios celulares en 2D y 3D para la sustitución de órganos y tejidos. Desde la perspectiva de la biología celular, los andamios deberán ser vistos como estructuras biomiméticas de la matriz extracelular. Los objetivos principales de los andamios son: a) definir un espacio sobre el cual será moldeado un tejido nuevo, b) sustituir temporalmente las funciones mecánicas y estructurales del tejido nativo y c) servir de guía al tejido en crecimiento [2-4].

Los andamios celulares pueden ser fabricados de diferentes formas (i.e. como membranas, esponjas, fibras, esferas, etc.) mediante el uso de diversas técnicas, tales como: electrohilado, depósito y lavado de partículas, separación de fases, extrusión, moldeo por fusión y liofilización; así como una combinación de dichos procedimientos [2-5]. Todas estas técnicas han tratado de satisfacer los requerimientos básicos de los andamios, dentro de los que destacan: una apropiada porosidad (para el flujo óptimo de nutrientes y desechos), un óptimo tamaño de poro (entre 5 y 10 veces mayor al diámetro de la célula) y una velocidad de biodegradación razonable durante el crecimiento *in vitro* e *in vivo* del tejido (esto para conservar la estabilidad mecánica del nuevo tejido); sin embargo, una desventaja de estas técnicas es que se obtienen andamios con propiedades mecánicas pobres e inhomogéneas. Debido a ello, actualmente se está haciendo un esfuerzo continuo por mejorar las propiedades y estabilidad mecánica de los biomateriales.

En los últimos años, los hidrogeles se han presentado como una excelente alternativa para ser empleados como andamios en ingeniería de tejidos. Lo anterior se debe a que poseen propiedades físicas y estructurales semejantes a las de la matriz extracelular (MEC) de muchos tejidos blandos; es decir, son elásticos, permeables y capaces de retener grandes cantidades de agua en su interior permitiendo el flujo de nutrientes y material de desecho. Los hidrogeles que pretendan ser empleados como andamios celulares deberán ser biocompatibles, permeables y altamente hidrófilos, así como contar con propiedades mecánicas similares a las del tejido a sustituir [6, 7].

El quitosano (CS) y el poli(alcohol vinílico) (PVA) son dos polímeros ampliamente estudiados que se han usado por separado o como una mezcla polimérica en diversas aplicaciones biomédicas [8-11].

Algunos investigadores han estudiado las propiedades físicas y químicas de los hidrogeles basados en CS [12-15]. Se sabe que el CS proporciona excelente biocompatibilidad, es biodegradable y tiene propiedades antimicrobianas; sin embargo, es un material frágil. Para mejorar las propiedades mecánicas del CS, se ha buscado mezclarlo con otros polímeros entre los cuales destaca el PVA. Algunos autores han llevado a cabo investigaciones para entender la respuesta mecánica, térmica y biológica de la mezcla CS/PVA [16-18]. De acuerdo a los resultados reportados en la literatura, es evidente que la mezcla proporciona un material con potencial para ser usado en aplicaciones biomédicas [9, 19].

Aunque la mezcla CS/PVA es frecuentemente propuesta para su uso como liberador de fármacos (5-fluorouracilo<sup>1</sup>, nano insulina, dexametasona<sup>2</sup>) [20-22], como andamio celular para la regeneración de: piel, hígado, cartílago y vasos sanguíneos [23-27] ó incluso como marcador fluorescente en medicina [28]; algunas de estas aplicaciones requieren mejores propiedades mecánicas que las que la mezcla CS/PVA puede ofrecer (~17 MPa en su módulo elástico y resistencia a la tensión de ~19 MPa). Diversos esfuerzos se han realizado por incrementar sus propiedades mecánicas con el fin de optimizar su uso.

---

<sup>1</sup> Antimetabolito usado en el tratamiento del cáncer de piel.

<sup>2</sup> Inmunosupresor y antiinflamatorio.

El entrecruzamiento físico y/o químico de la red polimérica ha mostrado mejorar el módulo elásticos y la resistencia a la tensión de la mezcla CS/PVA (~22 MPa y ~23.5 MPa, respectivamente) [29, 30]; particularmente, algunos estudios relacionados con las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles de CS/PVA reportan el uso de glutaraldehído (GA por su acrónimo en inglés) como agente entrecruzante para mejorar su comportamiento mecánico [23-25, 27, 31].

El genipin, es otro agente entrecruzante que se ha utilizado recientemente para mejorar la respuesta mecánica de la mezcla CS/PVA. Bispo et al. [32], demostraron que la mezcla CS/PVA entrecruzada con genipin es biocompatible y que el incremento del contenido de CS respecto al PVA disminuye el índice de hinchamiento de los hidrogeles [32].

Un entrecruzante que se ha utilizado muy poco en la mezcla CS/PVA es la epíclorhidrina (ECH por su acrónimo en inglés). Aunque existen un par de artículos donde se estudian fibras hechas a base de CS/PVA y entrecruzadas con ECH [33, 34], ninguno de ellos evalúa la influencia del agente entrecruzante sobre las propiedades mecánicas, estructurales y biológicas del material.

El objetivo de este trabajo consiste en proporcionar una metodología sencilla para determinar las variaciones mecánicas y estructurales de un hidrogel híbrido hecho a base de CS/PVA y entrecruzado por medios físicos (radiación UV) y químicos (ECH) para su uso como andamio celular en la regeneración de cartílago elástico. La metodología propuesta utiliza el módulo de corte obtenido a partir de ensayos de tracción uniaxial en combinación con teorías bien establecidas, tales como la teoría clásica de la termodinámica, la termodinámica estadística y el modelo de la red afín [35, 36], para determinar la influencia de los agentes entrecruzantes en los parámetros estructurales y propiedades mecánicas de los hidrogeles de CS/PVA/ECH.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis consiste en realizar la caracterización mecánica, estructural y biológica de un hidrogel híbrido hecho a base de quitosano (CS) y poli(alcohol vinílico) (PVA) entrecruzado químicamente con epíclorhidrina (ECH).

### *Objetivos particulares*

- Obtener hidrogeles de CS/PVA/ECH en forma de membranas delgadas a través del método de evaporación de los disolventes.
- Evaluar la cinética de absorción de las membranas de CS/PVA/ECH mediante pruebas de hinchamiento.
- Caracterizar las membranas sintetizadas por métodos espectroscópicos (DRX, FTIR y  $^1\text{H}$  RMN) y mecánicos (pruebas de tracción uniaxial).
- Relacionar las propiedades mecánicas de los hidrogeles con los parámetros estructurales que describen su red polimérica, a saber:
  - densidad de entrecruzamiento,  $\varphi_c$ ;
  - peso molecular entre puntos de entrecruzamiento,  $M_{crl}$ ;
  - tamaño de malla,  $D_N$ ; y
  - fracción volumétrica al equilibrio,  $v_s$ .
- Analizar la biocompatibilidad de los hidrogeles de CS/PVA/ECH mediante ensayos de viabilidad (calceína-AM/homodímero de etídio), citotoxicidad (MTT) y adhesión celular a su superficie (ESEM).
- Evaluar la viabilidad del andamio celular en la formación de cartílago elástico auricular mediante ingeniería de tejidos.



# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1. El Oído Externo

El oído u órgano vestibulococlear, es un órgano par situado en el hueso temporal del cráneo que se especializa en dos funciones distintas: el equilibrio y la audición. El oído permite el registro de las vibraciones del aire (ondas sonoras) las cuales, posteriormente se transforman en impulsos eléctricos que son interpretados por el cerebro como sonidos [37]. En cada oído se pueden distinguir tres partes: oído externo, oído medio y oído interno (Figura 1.1).

El oído externo puede ser definido como un aparato de transmisión, ya que durante el proceso de audición recoge las ondas sonoras del ambiente y las conduce al oído medio. El oído externo está formado por una parte externa, el pabellón auricular, y una interna, el conducto auditivo externo.

El pabellón auricular, aurícula u oreja, es la única parte visible del oído cuya función es localizar y amplificar los sonidos. Se localiza en la parte lateral del cráneo por debajo de la fosa temporal, delante y encima del hueso mastoideo [38].



Figura 1.1: Estructura del órgano vestibulococlear. *Adaptada de [39]*

El pabellón auricular presenta un esqueleto cartilaginoso muy resistente recubierto por pericondrio<sup>3</sup> y piel suave. Dicho esqueleto cartilaginoso está formado por cartílago elástico, el cual posee una matriz extracelular que contiene condrocitos, colágena tipo II y numerosas fibras de elastina dispuestas en forma aleatoria que le confieren su color amarillo característico [38]. El cartílago elástico aumenta de volumen mediante dos mecanismos: crecimiento intersticial (división de los condrocitos presentes en el cartílago) y crecimiento por aposición (formación de condroblastos a partir de células indiferenciadas en el pericondrio); no obstante, su capacidad de regenerarse es limitada [40].

Gracias a las fibras de elastina presentes en la matriz extracelular, el cartílago elástico posee una estructura flexible notablemente superior a la que muestran los cartílagos hialino y fibroso presentes en otras partes del cuerpo. Así, el cartílago elástico, sostiene el pabellón auricular y mantiene su estructura permitiéndole ser flexible, blando y resistente.

El pabellón auricular (Figura 1.2) cuenta con elevaciones y depresiones, las primeras son el hélix, el antehélix, el trago, el antitrago y el lóbulo (única porción que no posee cartílago elástico). La principal depresión es la concha, en la cual se abre el conducto auditivo externo, encargado de transmitir las ondas sonoras desde el pabellón auricular a la membrana timpánica [37, 38].

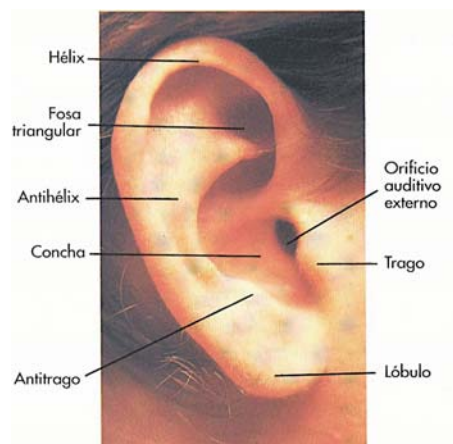


Figura 1.2: Esquema con las partes del pabellón auricular. <sup>[41]</sup>

<sup>3</sup> Capa de tejido conjuntivo denso irregular que rodea al tejido cartilaginoso, aportándole sustancias nutritivas

## 1.2. Malformaciones del oído externo

Las deformaciones del pabellón auricular se deben a una alteración en el desarrollo embrionario. Se pueden clasificar en 5 grupos dependiendo su gravedad, en orden descendente son [42, 43]:

- I. Anotia,
- II. Microtia,
- III. Hipoplasia del tercio medio de la oreja,
- IV. Hipoplasia del tercio superior de la oreja y
- V. Orejas prominentes

La anotia (Figura 1.3 A) es el caso más severo, se produce cuando existe una ausencia total del pabellón auricular. Mientras que la microtia (del latín “*micro*” que significa pequeño y “*otía*” = estado de la oreja) es una deformidad en la cual los pacientes tienen una oreja más pequeña de lo normal y con importantes cambios estructurales (Figura 1.3 B) [42, 45].

Se calcula que la microtia y la anotia se presentan en aproximadamente 1 de cada 6,000 a 7,000 nacimientos. Es más frecuente en hombres que en mujeres (2.5:1) y el 80% de los casos son unilaterales (sólo una oreja es afectada), siendo el lado derecho el más afectado [42].

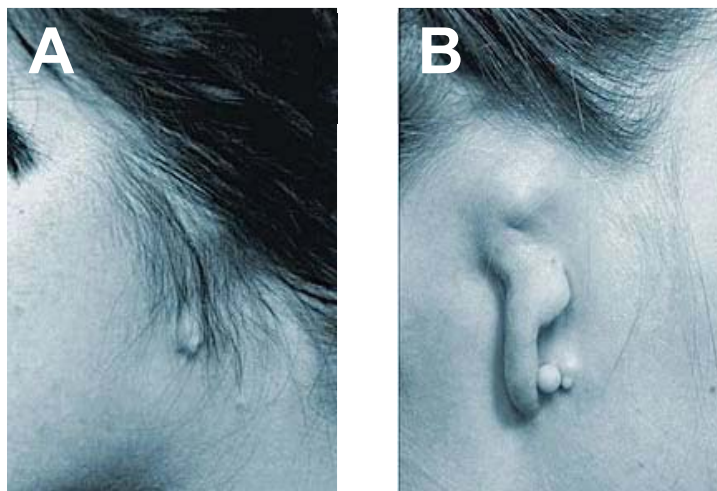


Figura 1.3: Malformaciones del pabellón auricular: A) anotia y B) microtia. <sup>[44]</sup>

### 1.2.1. Tratamiento

Aunque la aurícula representa una pequeña parte de la superficie total del cuerpo, es una de las estructuras tridimensionales más complejas. La reconstrucción de la estructura auricular puede llevarse a cabo de manera quirúrgica usando cartílago autólogo (procedente del mismo paciente), a través de implantes aloplásticos, o bien, mediante ingeniería de tejidos [46].

#### 1.2.1.1. Reconstrucción quirúrgica

Actualmente, el estándar de oro para la reconstrucción de la microtia y otras deformidades auriculares, es el uso de cartílago autólogo. Esta técnica fue desarrollada a mitad del siglo pasado por Tanzer [47]. Consiste en reconstruir el tejido dañado usando cartílago costal (de tipo hialino) del propio paciente, el cual, es esculpido por el cirujano para recrear la estructura tridimensional de la aurícula y posteriormente es implantado debajo de la piel periauricular (Figura 1.4) [47-50].

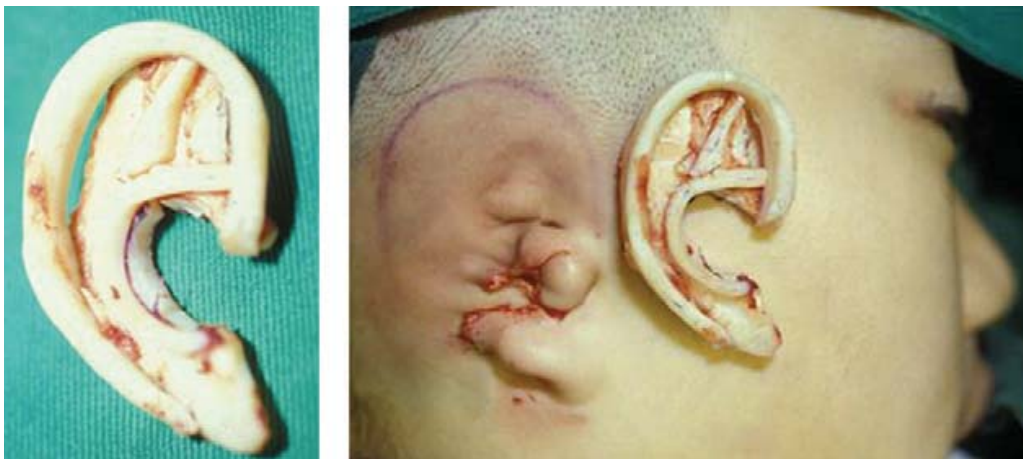


Figura 1.4: Reconstrucción auricular mediante el uso de cartílago costal. [50]

A pesar de la estabilidad a largo plazo y el alto grado de biocompatibilidad que se logra con este método; el uso de cartílago costal autólogo tiene numerosos inconvenientes, entre ellos destacan los siguientes: el gran número de cirugías necesarias, dolor postoperatorio, deformaciones del tórax, condritis, colapso

pulmonar o neumotórax<sup>4</sup>, infecciones, seroma<sup>5</sup> y necrosis del injerto y/o de la piel en el sitio de implante [45, 47]; aunado a la incapacidad del cartílago costal de replicar las complejas propiedades mecánicas del cartílago elástico auricular [46].

#### **1.2.1.2. Implantes aloplásticos**

De manera alterna, la reconstrucción de la microtia se puede lograr utilizando materiales sintéticos, los cuales podrían replicar el contorno y la elasticidad del cartílago de la oreja normal mucho mejor que el cartílago hialino costal. Tal es el caso de los implantes de silicón o de polietileno (Medpor<sup>®</sup>).

Inicialmente los implantes de silicón fueron los más empleados, no obstante, hoy en día el material más utilizado es el polietileno poroso. A pesar de los buenos resultados cosméticos que se han obtenido con ambos implantes, en mayor o menor frecuencia, se han presentado problemas de biocompatibilidad, mayor probabilidad de infección, riesgo de extrusión y su durabilidad a largo plazo resulta incierta debido a la degradación del material [46, 51, 52].

#### **1.2.1.3. Ingeniería de Tejidos**

Para evitar estas complicaciones y mejorar los resultados cosméticos y funcionales de la reconstrucción auricular, durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable por generar cartílago elástico mediante ingeniería de tejidos. Dicha estrategia, implica la fabricación de un andamio celular (hecho de biomateriales sintéticos, naturales o una combinación de ambos) que sustituya la estructura tridimensional del pabellón auricular y les brinde el soporte necesario a las células mientras se replican para formar el nuevo tejido. Así, el andamio celular tomará temporalmente el lugar de la matriz extracelular (MEC) del cartílago elástico.

La MEC es un sistema multicomponente complejo, está formada por constituyentes de bajo y alto peso molecular (glicosaminoglicanos, colágena,

---

<sup>4</sup> Presencia de aire en el espacio interpleural. Esto origina el colapso de los pulmones y compromete la función respiratoria del paciente.

<sup>5</sup> Acumulación de grasa líquida, suero y linfa debajo de la herida quirúrgica.

elastina, entre otros) producidos por las propias células para formar una red compleja. La MEC proporciona soporte mecánico a los tejidos, organiza a las células en tejidos específicos y controla el comportamiento celular. En otras palabras, la matriz extracelular, es una estructura dinámica que proporciona soporte estructural y de anclaje a las células para mejorar la arquitectura del tejido y la proliferación celular.

Con la finalidad de sustituir temporalmente a la MEC y dar lugar a la formación de un nuevo tejido, el andamio es cubierto con condrocitos auriculares del propio paciente para luego, ser cultivado de manera *in vitro* durante cierto tiempo y posteriormente ser implantado en el receptor para que continúe el crecimiento del tejido de forma *in vivo*. Con el tiempo, los condrocitos injertados formarán una nueva matriz extracelular cartilaginosa que reemplazará poco a poco al andamio celular, generando así un nuevo cartílago auricular [49].

Las ventajas de esta técnica son numerosas, ya que se evita el daño innecesario a otras zonas del cuerpo (como en el caso del uso de cartílago costal), es posible crear andamios con una forma específica, no es necesaria una gran cantidad de células para iniciar la formación del tejido y se evita un posible rechazo inmunológico al utilizar células autólogas [48, 51].

Tomando en consideración todo lo anterior, es posible concluir que el éxito de la regeneración de cartílago mediante ingeniería de tejidos requiere de dos elementos importantes: 1. células capaces de mantener su linaje y formar una matriz extracelular; y 2. andamios celulares biocompatibles, mecánicamente estables (para sustituir temporalmente las funciones del tejido nativo), degradables y con propiedades estructurales favorables para promover la adhesión, proliferación y condrogénesis [2-4, 51].

La postura más común y la más utilizada es la de emplear polímeros como medio de sostén de los condrocitos auriculares. Diversos polímeros tanto naturales como sintéticos se han estudiado para este propósito [45, 48, 49, 51, 53-55]; sin embargo, aún no se ha encontrado un material óptimo para la formación de implantes auriculares.

### 1.3. Hidrogeles

Durante los últimos años, se ha incrementado el uso de hidrogeles como andamios celulares en ingeniería de tejidos, esto es debido a que poseen propiedades mecánicas y estructurales similares a la matriz extracelular y a muchos tejidos biológicos [2, 9, 56, 57].

Los hidrogeles son redes macromoleculares reticuladas o entrecruzadas formadas por polímeros con grupos hidrófilos (principalmente grupos hidroxilo -OH, amidas -CONH<sub>2</sub>, ácidos carboxílicos -COOH y ácidos sulfónicos -SO<sub>3</sub>H). Pueden estar compuestos por cadenas poliméricas del mismo tipo o por una mezcla de polímeros. Se forman al unir las cadenas de sus componentes mediante enlaces químicos covalentes o bien mediante interacciones secundarias débiles y enredo de las cadenas poliméricas [58].

Estas redes tienen una alta afinidad por el agua y son capaces de absorber grandes cantidades de líquido (agua o fluidos biológicos) sin disolverse; lo anterior se debe al enmarañamiento y/o a los enlaces químicos formados entre las cadenas [59, 60]. El líquido penetra en la red polimérica hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, provocando así el hinchamiento del hidrogel [60].

Los hidrogeles completamente hinchados poseen propiedades físicas comunes a los tejidos vivos que los hacen idóneos para su uso como andamios celulares. Entre estas propiedades destacan: su contenido de agua relativamente alto, su permeabilidad al oxígeno y nutrientes, su estructura suave y elástica, así como su baja tensión interfacial con el agua o fluidos biológicos. De este modo, la naturaleza elástica de los hidrogeles una vez hinchados, minimiza la irritación a los tejidos circundantes después de su implantación y la baja tensión interfacial entre la superficie del hidrogel y los fluidos corporales, favorece el transporte de oxígeno y nutrientes a las células [61].

El grado de hinchamiento del hidrogel depende principalmente de dos factores: la hidrofiliidad de sus cadenas poliméricas y su densidad de entrecruzamiento [59]. Incrementar la densidad de entrecruzamiento del sistema se traducirá en un hidrogel con mayor resistencia a la tensión que la presentada por el mismo hidrogel sin

entrecruzar; sin embargo, esto disminuirá su hinchamiento y elasticidad; por lo que se debe buscar un grado óptimo de reticulación que permita obtener las propiedades biológicas, mecánicas y estructurales necesarias para satisfacer los exigentes requerimientos a los que estará sometido el hidrogel una vez dentro del cuerpo.

### **1.3.1. Clasificación**

Los hidrogeles se pueden clasificar con base en diferentes propiedades, tales como el método de preparación, su estructura física, cargas iónicas, biodegradabilidad, tipo de entrecruzamiento, naturaleza de los polímeros que lo conforman, entre otras. Para este trabajo son de mayor relevancia las dos últimas, el tipo de entrecruzamiento presente en la red polimérica y el origen de los polímeros que forman el hidrogel.

#### **1.3.1.1. Por el tipo de entrecruzamiento**

En aplicaciones como andamios celulares o membranas de filtración los hidrogeles no solo necesitan ser estables en condiciones húmedas, sino también resistentes a una combinación de esfuerzos químicos y mecánicos, por lo cual es necesario estabilizarlos. La reticulación o entrecruzamiento de su red polimérica es una manera de lograrlo, pudiéndose llevar a cabo de dos formas: una de ellas consiste en someter el hidrogel a distintos procesos físicos, mientras la segunda implica el uso de agentes químicos.

Así, con base en el tipo de entrecruzamiento que presenta su red polimérica los hidrogeles se pueden clasificar como “*hidrogeles químicos*” o irreversibles, o bien como “*hidrogeles físicos*” o reversibles [59].

En los *hidrogeles químicos* (Figura 1.5 A), el entrecruzamiento es a causa de la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas poliméricas del hidrogel. Esto gracias a la acción de un agente entrecruzante [58]. Los agentes entrecruzantes, son moléculas bifuncionales o multifuncionales de bajo peso molecular, que estabilizan a los hidrogeles debido a la unión o enlace entre los



grupos funcionales presentes en el sistema. Estos hidrogeles poseen una estructura polimérica mucho más rígida y no pueden ser disueltos en agua u otros disolventes a menos que el enlace covalente sea roto.

Por el contrario, en los *hidrogeles físicos* (Figura 1.5 B) la unión entre cadenas se debe a enlaces secundarios débiles tales como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enmarañamiento entre cadenas poliméricas, cristalización, entre otras [59]. Debido a ello, este tipo de hidrogeles presentan una red polimérica tridimensional formada por uniones que no son completamente estables y pueden ser disueltos si se altera la temperatura, pH, y/o fuerza iónica del medio en el que se encuentren inmersos [2, 58-60].

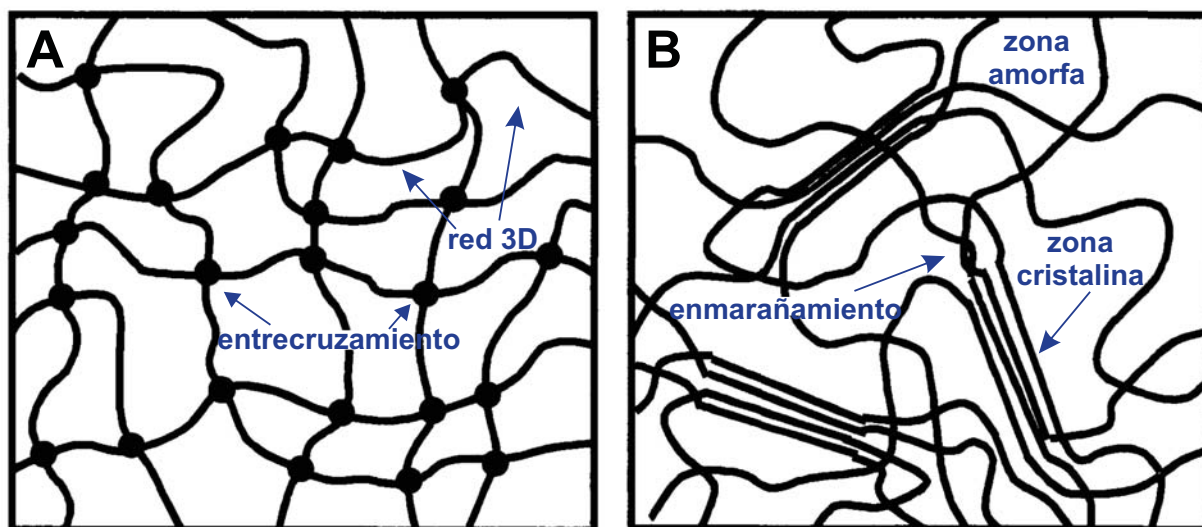


Figura 1.5: Representación esquemática de la red polimérica de un hidrogel: A) químicamente entrecruzado, B) físicamente entrecruzado. <sup>[59]</sup>

### 1.3.1.2. Por el origen de los polímeros

De acuerdo con el origen de los polímeros que conforman el hidrogel, estos se pueden clasificar en hidrogeles naturales, sintéticos o híbridos.

Los hidrogeles sintéticos son atractivos para su uso en ingeniería de tejidos debido a que sus propiedades mecánicas, estructurales y fisicoquímicas pueden ser fácilmente controladas y reproducidas en el laboratorio mediante la modificación de la estructura química del polímero precursor (i.e. peso molecular, sustituyentes de la

cadena principal, arreglo estereoquímico de la molécula, quiralidad, entre otros) y la reacción de polimerización [56]. Entre los materiales sintéticos más usados para la formación de hidrogeles se encuentran: el polietilenglicol, poli(óxido de etileno), polifosfaceno, poli(fumarato de propileno) y el poli(alcohol vinílico) (PEG, PEO, PPF y PVA, por sus siglas en inglés respectivamente) [56, 62].

Asimismo, los polímeros sintéticos poseen una mejor estabilidad térmica y sus propiedades mecánicas (deformaciones  $>250\%$  y módulos elásticos del orden de  $1 \times 10^9$  Pa) son superiores en comparación con algunos polímeros naturales; sin embargo, la mayoría de ellos no promuevan la adhesión celular, no se degradan bajo condiciones fisiológicas y pueden incluir residuos de iniciadores u otros componentes o impurezas que alteren el crecimiento celular [63].

A diferencia de los polímeros sintéticos, los polímeros de origen natural se han usado con mayor frecuencia como andamios celulares debido a que han demostrado ser biocompatibles, degradables bajo condiciones fisiológicas y promover la interacción celular [56]. Esto se debe a que la mayoría de los polímeros naturales poseen propiedades macromoleculares similares a la matriz extracelular o bien son componentes de ella.

La principal desventaja de los polímeros naturales es que generalmente presentan un intervalo muy limitado de propiedades mecánicas (deformaciones  $<100\%$  y módulos elásticos del orden de  $1 \times 10^4$  Pa) y exhiben variaciones significativas tanto en sus propiedades mecánicas como fisicoquímicas. Algunos de los polímeros naturales más empleados incluyen proteínas como la colágena y la grenetina; glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina; o polisacáridos como la celulosa, el alginato, la agarosa y el quitosano (CS) [62].

La mezcla de polímeros naturales y sintéticos pueden formar una nueva clase de materiales denominados híbridos, los cuales son biocompatibles y presentan mejores propiedades fisicoquímicas y mecánicas comparadas con las de sus componentes individuales [63]. Debido a ello, los hidrogeles híbridos se han perfilado como materiales sumamente prometedores para aplicaciones biomédicas.

## 1.4. Quitosano

El quitosano (CS) es un polímero semicristalino que existe en la naturaleza como quitina, la cual, es un compuesto macromolecular formado por unidades repetidas de N-acetil-2-amino-desoxi-D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4) (Figura 1.6 A) [64]. La quitina es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos e insectos, en los moluscos, anélidos, protozoarios, algas y en la mayoría de los hongos [62, 64].

A partir de la desacetilación bajo condiciones alcalinas de la quitina, se obtiene el CS, un polisacárido lineal compuesto por unidades  $\beta$ -(1,4) 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (Figura 1.6 B) [64]. Debido a que el 100% de la desacetilación de la quitina nunca se logra, en realidad el CS actúa como un copolímero formado por unidades repetidas de N-acetil glucosaminas y N-glucosaminas unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(1,4) (Figura 1.7). La proporción de cada una de estas unidades repetidas en la macromolécula variará conforme al grado de desacetilación (DA) conseguido, el cual, generalmente oscila entre el 56% - 99% [8, 31, 65]. Así, el grado de DA del CS es un indicador del contenido de grupos amino libres en las cadenas de CS.

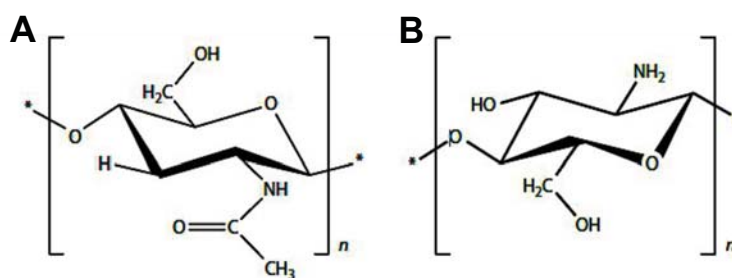


Figura 1.6: Estructura química de la unidad repetida de A) la quitina y B) el quitosano. [65]

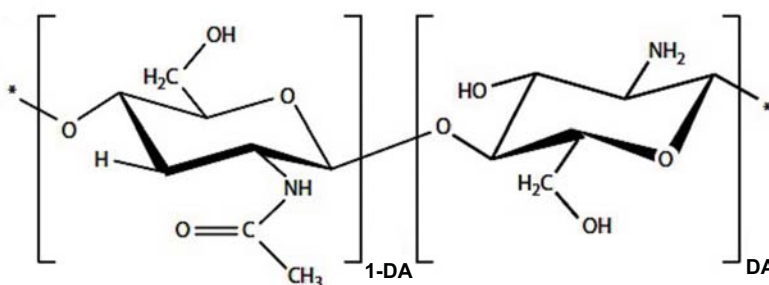


Figura 1.7: Estructura química de la unidad repetida del quitosano parcialmente desacetilado. [65]

De igual modo, el grado de DA influye en la viabilidad biológica y en las propiedades fisicoquímicas del CS como solubilidad, cristalinidad, viscosidad, floculabilidad, capacidad de intercambio iónico, reactividad y respuesta celular, entre otras propiedades [64, 65].

A diferencia de la quitina, el CS es soluble en ácidos diluidos debido a la protonación de los grupos amino libres en cada unidad desacetilada ( $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$ ) [64]. De esta manera, el CS posee cargas iónicas positivas que facilitan su unión química con grasas, iones metálicos, proteínas, glicosaminoglicanos<sup>6</sup> aniónicos (GAGs) y otras moléculas cargadas negativamente [65].

El CS es un polímero natural, degradable, biocompatible, no tóxico, antibacteriano, antifúngico, mucoadhesivo, cicatrizante, con alta densidad de carga y estructuralmente similar a los GAGs [62, 64]. Gracias a esto, el CS ha sido ampliamente usado en diversas aplicaciones biomédicas, entre ellas: fabricación de suturas, como agente liberador de fármacos, piel artificial, en la regeneración de hueso, cartílago, nervios y vasos sanguíneos; así como en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. [12, 63-65, 67]. La ventaja del CS sobre otros polisacáridos como la celulosa, el almidón o el agar se atribuye no solo a sus excepcionales características, si no también a su estructura química, la cual, permite realizar modificaciones específicas sin grandes dificultades gracias al grupo amino ubicado en el carbono dos del anillo sacárido. Además, el CS es biodegradado por enzimas lisosomales presentes en el cuerpo, lo cual, hace al CS un material interesante y prometedor para aplicaciones en ingeniería de tejidos [65].

Se ha reportado que el entrecruzamiento iónico y covalente del CS con glutaraldehído (GA), genipin, diisocianatos, dialdehidos o epíclorhidrina permite la formación de hidrogeles estables, insolubles y cristalinos [14, 32, 33, 68]. Debido a su cristalinidad, los hidrogeles de CS son frágiles, por lo que unir el CS a polímeros sintéticos, entre los que destaca el PVA, ha sido una forma interesante de mejorar sus propiedades mecánicas y extender su uso como andamio celular en la regeneración de diversos tejidos.

---

<sup>6</sup> Biomoléculas estructurales presentes en el tejido conectivo, epitelial y óseo, así como en la matriz extracelular. Presentan una elevada densidad de carga eléctrica negativa y están compuestas por polisacáridos lineales, no ramificados [66].

### 1.5. Poli(alcohol vinílico)

El poli(alcohol vinílico) (PVA, por su acrónimo en inglés) es un polímero sintético, semicristalino, altamente hidrófilo, obtenido por primera vez en 1924 a través de la hidrólisis alcalina de los grupos acetato del poli(acetato de vinilo) [69]. La hidrofiliidad y solubilidad del PVA se puede controlar fácilmente modificando su grado de hidrólisis y peso molecular .

Debido a su baja citotoxicidad, elasticidad y alta hidrofiliidad, los hidrogeles de PVA han sido utilizados en ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago articular, páncreas y formación de hueso [9, 62, 69]. No obstante, se ha comprobado que el PVA no promueve la adhesión celular y no degrada bajo la mayoría de las situaciones fisiológicas, razón por la cual es comúnmente usado junto a otros polímeros de origen natural [69].

La versatilidad de este polímero sintético se debe a la presencia de un grupo hidroxilo (-OH) en la unidad de repetición (Figura 1.8) cuya funcionalidad permite el injerto de otras cadenas laterales de PVA o bien de otros polímeros. Así, la posibilidad de emplear diversas estrategias de reticulación, permite obtener redes poliméricas con diferentes características físicas y químicas.

El PVA puede formar hidrogeles al entrecruzar los grupos hidroxilo con moléculas de diisocianato de difenilmetano o con epiclorhidrina [29, 56, 62, 69]. Dependiendo del entrecruzante utilizado, se formarán hidrogeles con propiedades mecánicas diferentes. El principal inconveniente en el uso de tales entrecruzantes es su toxicidad, lo cual, compromete la biocompatibilidad del polímeros debido a la posible liberación de moléculas remanentes de entrecruzante después de la gelificación [69].

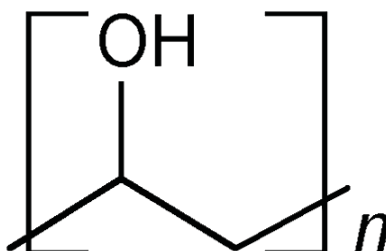


Figura 1.8: Estructura química de la unidad repetida de poli(alcohol vinílico).<sup>[69]</sup>

## 1.6. Epiclorhidrina

La epiclorhidrina (ECH) es un compuesto organoclorado y un epóxido (Figura 1.9). Debido al anillo oxirano que posee en su estructura, la ECH es un compuesto altamente reactivo, siendo capaz de reaccionar con grupos hidroxilo (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>) y carboxilo (-COOH) [70].

La ECH es miscible en la mayoría de los disolventes orgánicos polares [71]. Gracias a su alta reactividad, la ECH es empleada como agente entrecruzante en la formación de resinas [72].

A diferencia de otros entrecruzantes comúnmente usados, como el glutaraldehído, que únicamente reaccionan con los grupos amino en la mezcla CS/PVA, la ECH puede reaccionar tanto con los grupos funcionales del CS (-NH<sub>2</sub> y -OH) como con los del PVA (-OH). Esta bifuncionalidad permite conservar un mayor número de grupos -NH<sub>2</sub> libres en la red polimérica, manteniendo así, la funcionalidad química de las cadenas [33]. Debido a esto, la ECH fue seleccionada en este trabajo para la formación de hidrogeles estables.

Adicionalmente, es sabido, que al entrecruzar los hidrogeles con ECH mejora considerablemente su resistencia a la tensión [70, 73]; sin embargo, se debe tener la certeza de la ausencia de trazas de ECH tras la reacción, pues es considerado un compuesto carcinógeno y posiblemente genotóxico [74].

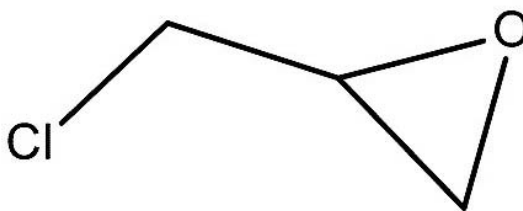


Figura 1.9: Estructura química de la molécula de epiclorhidrina (ECH).<sup>[74]</sup>

## 1.7. Estado del arte

### 1.7.1. Andamios usados en la regeneración auricular

Hasta el momento, numerosos biomateriales tanto sintéticos como naturales han sido estudiados y elaborados en diferentes formas (suspensiones, fibras, membranas, esponjas, geles, etc.) con la finalidad de ser empleados como andamios celulares para la regeneración mediante ingeniería de tejidos de una estructura auricular; sin embargo, aún no se ha encontrado el material ideal.

Las primeras investigaciones sobre el tema se dan en 1992 con Vacanti et al. [75], quienes demostraron que el neocartílago formado sobre andamios de PGA/PLLA (poliácido glicólico/poliácido láctico) es capaz de mantener la forma de una oreja humana únicamente durante las primeras 7 semanas de cultivo *in vivo* en ratones atímicos. Nuevamente en 1997, Cao y Vacanti [76] lograron desarrollar un neocartílago con forma de oreja. Los autores sembraron condrocitos sobre un polímero biodegradable de PGA/PLLA con la apariencia de la oreja de un niño de 3 años; sin embargo, una vez más el constructo (andamio + células) no fue capaz de mantener su configuración durante el cultivo *in vitro*.

En 1998, Britt y Park [77] también trabajaron con un copolímero de PGA/PLLA en forma de oreja, pero a diferencia de Cao y Vacanti [76], Britt y Park [77] únicamente reportaron la pérdida de los detalles finos en el implante auricular una vez que el neocartílago se formó.

Fussenegger et al. [78] y Ruszymah et al. [40], en 2003 y 2008 respectivamente, estudiaron andamios de fibrina humana y ácido hialurónico. Ellos reportan que la fibrina se degradada rápidamente por los condrocitos y demuestran la formación *in vivo* de neocartílago cuando la suspensión es usada para rellenar defectos auriculares simples. Sin embargo, concluyen que es necesario realizar una caracterización más profunda del neocartílago con la finalidad de garantizar sus propiedades histológicas y su integridad estructural.

También en 2003, Kamil et al. [79] reportaron que una estructura auricular del tamaño de una oreja de adulto podía ser desarrollada en 12 semanas mediante el

cultivo *in vitro* de condrocitos articulares bovinos sobre un polímero derivado del ácido hialurónico denominado *Hyaff 1*. Los análisis histológicos y bioquímicos mostraron que los andamios son reemplazados poco a poco por el neocartílago y son capaces de mantener su forma y tamaño durante las primeras 12 semanas de cultivo *in vitro*. No obstante, no hubo una distribución uniforme de condrocitos ni de glicosaminoglicanos (GAGs) sobre el andamio.

En 2004, Shieh et al. [48] estudiaron tres diferentes andamios poliméricos: poli(ácido glicólico), poli( $\epsilon$ -caprolactona) y poli(4-hidroxitirato). Sobre cada polímero sembraron condrocitos auriculares y después de algunas semanas de cultivo *in vitro* les realizaron una serie de análisis histológicos. Los resultados revelaron la formación de neocartílago con una distribución de condrocitos en lagunas y rodeados por una matriz cartilaginosa basófila, similar al cartílago auricular nativo. Además, antes de ser implantados en conejos y ratones atímicos, el contenido de colágena y GAGs del neocartílago era comparable con el tejido nativo. Tras 10 meses de cultivo *in vivo*, los constructos fueron nuevamente examinados y encontraron que el neocartílago presentaba una forma auricular de pobre a moderada.

Tanto en 2002 como en 2004, Park et al. [80, 81] desarrollaron neocartílago a partir de condrocitos humanos sobre andamios de PGA/PLLA. Además del análisis histológico correspondiente, Park y colaboradores son de los pocos investigadores que también se enfocaron en el análisis biomecánico del neocartílago. A lo largo de sus estudios encontraron que el neocartílago formado era similar al tejido nativo auricular en los 4 parámetros mecánicos estudiados, a saber: resistencia a la tensión última (UTS, por sus siglas en inglés), rigidez, resiliencia y tenacidad. Sin embargo, durante el análisis histológico se halló que en la matriz extracelular había pocas fibras de elastina y los condrocitos presentes eran muy pequeños y escasos. Park et al. [80] también caracterizaron mecánicamente el cartílago auricular humano, encontrando que su módulo elástico es de 5.11 - 12.2 MPa, su UTS de 2.18 - 8.8 MPa y puede deformarse hasta un 15% respecto a su longitud original.

Por su parte, Wu et al. [82] en 2007 estudiaron andamios inyectables a base de plasma rico en plaquetas para la regeneración de cartílago auricular. En dichos



andamios, se embebieron condrocitos y se cultivaron de manera *in vivo*, pero una vez transcurrido el periodo de cultivo, el andamio no mantuvo la integridad estructural y produjo una respuesta inflamatoria.

Andamios de hidroxiapatita recubierta con poliuretano fueron estudiados por Chetty et al. [83] en 2008. Ellos encontraron que el andamio permite el crecimiento de fibroblastos, los cuales podrían ser utilizados para reemplazar el tejido auricular a pesar de no pertenecer a la misma línea celular del tejido nativo. No obstante, su análisis histológico no mostró una distribución homogénea de GAGs en el nuevo cartilago.

Recientemente, en el 2011, Dahl et al. [45] estudiaron andamios electrohilados de un copolímero a base de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico). Los andamios se sembraron con células mesenquimales de cordón umbilical y se mantuvieron bajo cultivo *in vitro* por 21 días. Transcurrido este tiempo, los constructos fueron comparados histológicamente con el cartilago nativo humano, demostrando alta diferenciación celular hacia condrocitos y la expresión de colágena tipo X, con lo que se concluyó que puede ser un material viable para la formación de un implante cartilaginoso.

En 2013, Reiffel et al. [49] demostraron que al implantar condrocitos auriculares bovinos sobre un andamio de colágena tipo I con forma de oreja, este es capaz de promover la proliferación celular y formar un neocartilago que mantiene la forma inicial del andamio. Además, encontraron que las propiedades mecánicas del andamio se incrementan a medida que el neocartilago se va formando.

Por otro lado, Sterodimas y Faria [84] determinaron que sus andamios de alginato/seda sembrados con condrocitos auriculares de conejo, forman un neocartilago histológicamente similar al tejido nativo tras 8 semanas de cultivo *in vivo*. Encontraron que el andamio disminuye su tamaño pero mantiene su forma y flexibilidad; afirmando lo anterior a pesar de no haber realizado pruebas mecánicas del andamio ni del neocartilago.

También en 2013, Nimeskern et al. [54] emplearon un novedoso andamio hecho a base de nanocelulosa bacteriana. El andamio puede ser elaborado con la apariencia de la oreja sana del paciente, mediante el diseño de un molde en un

programa asistido por computadora. Sin embargo, a pesar de ser de los pocos trabajos en lo que se reporta la caracterización mecánica de los andamios y del cartílago auricular nativo, ellos no reportaron haber realizado estudios para evaluar la viabilidad celular y biocompatibilidad de su material [54].

Así, con base en todas estas investigaciones, se ha determinado que los andamios celulares que pretendan ser empleados en la reconstrucción auricular deberán cumplir con ciertos requisitos que permitan fortalecer el éxito clínico del implante. Entre estos requisitos se encuentran: proveer al neocartílago de cierta estabilidad mecánica, asegurando así un soporte tridimensional para el desarrollo y replicación celular; mantener una forma predeterminada, es importante que los constructos no cambien de forma y al mismo tiempo cuenten con la elasticidad, resistencia a la tensión última y módulo elástico de una oreja normal (~15%, 2.18 - 8.8 MPa y 5.11 - 12.2 MPa, respectivamente de acuerdo con los estudios de Park et. al. [80]); ser biocompatibles y fungir como una guía durante la proliferación celular para lograr una distribución uniforme de las células y GAGs sobre el andamio.

A pesar de que algunos investigadores han demostrado que es posible generar neocartílago con formas predeterminadas, como una oreja humana [48, 75-77, 85]; el principal problema de la reconstrucción auricular mediante ingeniería de tejidos es que la estructura auricular formada no mantiene su apariencia a lo largo del tiempo.

La principal causa de ello radica en que el andamio comienza a degradarse antes de que la matriz extracelular cubra completamente su superficie. Lo anterior se suma a las propiedades mecánicas deficientes que posee el material para soportar las fuerzas externas a las que se ve sometido una vez que es implantado para su crecimiento *in vivo*.

Desde 2003, Chang et al. [86], ya señalaban la necesidad de realizar investigaciones en donde se estudien tanto las propiedades mecánicas del cartílago auricular nativo como las de los andamios usados para su regeneración.

De esta forma, el éxito en la producción de implantes cartilaginosos mediante ingeniería de tejidos requiere de una caracterización más científica y cuantitativa del material empleado como andamio, lo cual incluye evaluaciones morfológicas, bioquímicas, funcionales, histológicas y mecánicas.

### 1.7.2. Mezcla CS/PVA

De acuerdo con Jeon et al. [87], el uso de CS como biomaterial para la regeneración de cartílago ayuda a mantener la integridad estructural del andamio, debido a que la formación del nuevo tejido es más rápida gracias a la presencia de los grupos amino que posee este polímero.

Es bien sabido que el quitosano es un polisacárido que posee excelente biocompatibilidad y bioactividad; sin embargo, como muchos polímeros naturales, presenta propiedades mecánicas pobres. Debido a esto y a los resultados encontrados, decidimos mezclarlo con PVA. El PVA es un polímero sintético con buenas propiedades físicas y químicas pero limitada bioactividad.

De esta manera, al mezclar ambos polímeros estamos tratando de cumplir con los requerimiento mecánicos, estructurales y biológicos necesarios para lograr un implante auricular con características similares a las del tejido nativo. A pesar de que en los últimos años la mezcla CS/PVA ha sido muy estudiada, su uso en la reconstrucción del pabellón auricular aún no ha sido explorada.

Bahrami et al. [31], en 2003, estudiaron las propiedades físicas y mecánicas de la mezcla de CS/PVA entrecruzada con glutaraldehído (GA) al variar las proporciones de cada uno de los componentes. En sus estudios se reporta que el CS puro es más frágil en comparación con el PVA y que a medida que la proporción de PVA se incrementa en la mezcla, de igual modo lo hacen sus propiedades físicas y mecánicas. Bahrami et al. [31], también reportan que el GA mejora las propiedades mecánicas del hidrogel pero disminuye la cantidad de agua que es capaz de absorber.

Khurma et al. [88] elaboraron hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con genipin, un agente entrecruzante natural 10 veces menos citotóxico que el GA. Ellos encontraron que el genipin únicamente reacciona con los grupos amino del CS, dejando libres los grupos hidroxilo del PVA, razón por la cual, el índice de hinchamiento que pueden alcanzar estos hidrogeles es mayor al de aquellos entrecruzados con GA.

En 2007, Rodrigues et al. [89] observaron que en los hidrogeles de CS/PVA un alto contenido de CS en la red polimérica disminuye la cristalinidad del PVA; mientras que el incrementar la cantidad de PVA mejora el índice de hinchamiento de los hidrogeles.

Por su parte, Mathews et al. [23] en 2008, trabajaron con andamios tubulares de CS/PVA para aplicaciones en tejido cardiaco. Durante la síntesis del hidrogel aplicaron ciclos de congelación-descongelación y estudiaron el efecto que tenían sobre las propiedades mecánicas y estructurales del material. Encontraron que a mayor número de ciclos se obtiene una estructura más porosa y resistente.

En 2009, Costa-Junior et al. [24] también estudiaron la mezcla de CS/PVA entrecruzada con GA para formar membranas. Sin embargo, a diferencia de Bahrami et al. [31], en su estudio no solo caracterizaron las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles, sino que además, investigaron su biocompatibilidad y citotoxicidad. Encontraron que, en una proporción 1/1 v/v (CS/PVA) se forma una estructura rígida entre las cadenas de CS/PVA debido a un balance entre los grupos funcionales amino e hidroxilo. De acuerdo con las pruebas histológicas, los hidrogeles presentan buena compatibilidad y nula toxicidad; pudiendo emplearse como andamios para la regeneración de piel [24].

En 2010, El-Hefian et al. [10] analizaron la mezcla de CS y PVA variando la proporción de este último. Ellos reportan la formación de membranas homogéneas no porosas, además encontraron que a medida que se incrementa el contenido de PVA de igual manera lo hace el porcentaje de hinchamiento del hidrogel.

Zhuang et al. [17] en 2012, estudiaron la mezcla de CS/PVA para su posible uso en la regeneración tisular guiada, la cual consiste en reconstruir tejidos mediante el uso de una membrana que actúe como barrera para prevenir la invasión de otros tejidos. En su investigación modificaron las proporciones de CS en la mezcla y determinaron que la proporción 2/1 v/v (CS/PVA) es la que mejor biocompatibilidad presenta.

Una aplicación interesante de la mezcla CS/PVA fue estudiada por Alhosseini et al. [90]. Ellos utilizaron la mezcla CS/PVA para desarrollar tejido neural mediante la técnica de electrohilado; demostraron que la adición de pequeñas

cantidades de CS a los andamios de PVA, mejora la viabilidad y proliferación de las células nerviosas.

He Z. y Xiong L. [18] sintetizaron en 2012 una serie de hidrogeles de CS/PVA en forma de membranas usando como entrecruzante GA. Ellos determinaron que estos hidrogeles pueden ser considerados como materiales potenciales para su uso en ingeniería de tejidos debido a su hidrofiliidad, nula citotoxicidad, compatibilidad con la sangre y a su capacidad de mantener el linaje de las células sembradas sobre ellos.

La mezcla de CS y PVA también ha sido estudiada en otras aplicaciones biomédicas, como la liberación controlada de fármacos.

En 2012, Zu et al. [21] desarrollaron hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con GA para liberar nano insulina de manera transdérmica. Los resultados de su estudio demuestran que estos hidrogeles son un sistema prometedor para el tratamiento no invasivo de la diabetes, ya que muestran ser resistentes y la cinética de liberación del fármaco resulta aceptable.

Islam et al. [91], en 2013, sintetizaron hidrogeles de CS/PVA entrecruzados químicamente con tetraetil ortosilicato (TEOS) para ser empleados como liberadores de progesterona. En sus estudios encontraron que la cristalinidad del hidrogel incrementa a medida que la proporción de TEOS aumenta en la mezcla, este comportamiento se mantiene hasta llegar a un contenido máximo de TEOS y posteriormente la cristalinidad comienza a decrecer. Los hidrogeles de CS/PVA/TEOS no mostraron ser tóxicos, son capaces de promover y mantener el crecimiento celular, y la velocidad de liberación de progesterona mostró ser dependiente del pH del medio, siendo mayor en disoluciones ácidas [91].

A pesar de que existen numerosas publicaciones respecto a la caracterización y aplicaciones de la mezcla de quitosano y poli(alcohol vinílico); hasta el momento no se han encontrado reportes en donde se estudie la influencia de los elementos entrecruzantes (físicos y químicos) sobre los parámetros estructurales, comportamiento mecánico y la viabilidad de las células sobre un hidrogel híbrido

hecho a base de CS/PVA/ECH y cuyo uso potencial se encuentre en la regeneración de tejido auricular humano.

Es por eso, que el objetivo principal de este trabajo, consiste en proponer una metodología que ayude a determinar las propiedades mecánicas y estructurales de un hidrogel híbrido hecho a base de CS/PVA, entrecruzado por medios físicos (radiación UV) y químicos (ECH) para su posible uso como andamio en la regeneración de cartilago elástico.

Para ello, se evaluó la influencia de los procesos de entrecruzamiento físicos y químicos, sobre el comportamiento mecánico de los hidrogeles en estado hidratado, así como la viabilidad de las células sembradas sobre su superficie.

La metodología aquí presentada, considera el módulo de corte obtenido a partir de pruebas de tensión uniaxial para determinar la influencia de los agentes entrecruzantes sobre los parámetros mecánicos y estructurales de la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH. Lo anterior, pudo llevarse a cabo mediante la combinación de diversas teorías que describen el comportamiento de la red polimérica, a saber, termodinámica clásica, termodinámica estadística, modelo de la red afín y mecánica de sólidos [35, 36].

## CAPÍTULO 2

### **METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

En esta sección se presentan los detalles particulares sobre la preparación de la mezcla polimérica, así como, de los procesos físicos y químicos empleados para el entrecruzamiento de los hidrogeles de CS/PVA. También, se describe la metodología utilizada para evaluar la influencia de los agentes entrecruzantes en la estructura y comportamiento mecánico de los hidrogeles.

#### **2.1 Preparación de los hidrogeles**

En este trabajo se estudió un hidrogel híbrido formado a base de un polímero natural, quitosano (CS), y un polímero sintético, poli(alcohol vinílico) PVA. El hidrogel fue entrecruzado químicamente con epiclorhidrina (ECH) y sintetizado en forma de membranas delgadas mediante la evaporación de los disolventes empleados. Dicha técnica es conocida en inglés como *casting solve*.

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizó PVA con un peso molecular promedio peso ( $M_w$ ) de 89,000 Da y 99% de hidrólisis (Fluka; Buch, Suiza). CS con peso molecular promedio de 350,000 Da y una desacetilación  $\geq 75\%$  (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). ECH grado analítico (99% de pureza), ácido acético glacial (99.9997% de pureza) y agua desionizada; tanto el ácido acético como la ECH fueron comprados a Sigma-Aldrich. Todos los reactivos fueron usados tal como se recibieron.

##### **2.1.1 Disolución de CS (2.5% p/v)**

Para preparar la disolución de CS (2.5% p/v) se utilizó un matraz Erlenmeyer; en él se prepararon 225 mL de ácido acético al 1% v/v, para lo cual se mezclaron 222.75 mL de agua desionizada y 2.25 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, en la balanza analítica (Adventurer Pro, OH,AUS, EUA) se pesaron 5.625 g de CS,

los cuales se añadieron lentamente al ácido acético al 1% v/v; obteniendo así una concentración de CS en la disolución de 2.5% p/v.

La disolución se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, se agitó mecánicamente (Ultra-Turrax<sup>®</sup> UTC, IKA, EUA) a 1500 rpm durante 30 minutos para disolver completamente el CS y obtener una suspensión homogénea ligeramente amarilla.

### **2.1.2 Disolución de PVA (7.8% p/v)**

La disolución de PVA al 7.8% p/v se preparó disolviendo 17.55 g de PVA (previamente pesados en la balanza analítica) en 225 mL de agua desionizada. La disolución de PVA se mantuvo a 80 °C bajo agitación magnética durante 3 horas para obtener una disolución homogénea e incolora.

### **2.1.3 Mezcla CS/PVA y entrecruzamiento químico**

La mezcla de CS/PVA se hizo en una proporción 2/1.5 v/v (CS/PVA), para ello, se mezclaron 107.5 mL de PVA (7.8% p/v) con 142.5 mL de CS (2.5% p/v). La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente por 3 horas hasta que el PVA y el CS formaron una suspensión uniforme.

Posteriormente, a la mezcla de CS/PVA se le añadió el agente entrecruzante (625 µL de ECH) y 1 mL de NaOH 1M como catalizador. La mezcla CS/PVA/ECH se agitó por 1 hora a 40 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La concentración final de ECH en la mezcla fue de 0.25% v/v.

En cajas petri de polietileno (90x15 mm) se colocaron 15 g de la de la disolución entrecruzada y se dejaron secar a 37 °C para evaporar el disolvente y formar así las membranas. Tras 72 horas de secado, las membranas se retiraron de las cajas petri y se lavaron varias veces con NaOH 0.1 M y agua destilada para neutralizarlas y eliminar las trazas de reactivos que no alcanzaron a reaccionar.



El espesor de las membranas de CS/PVA/ECH se midió con ayuda de un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón) y posteriormente se almacenaron en un desecador (Bel-Art Products, EUA) hasta su uso.

En el capítulo 3 se presenta el mecanismo de la reacción de entrecruzamiento entre la ECH y la mezcla CS/PVA. Además, se propone la estructura molecular de la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH tras su entrecruzamiento químico con ECH.

#### **2.1.4 Esterilización de las membranas de CS/PVA/ECH**

Todos los materiales que pretendan ser empleados como implantes médicos deberán ser esterilizados para evitar la contaminación bacteriana en el paciente. Asimismo, es necesario considerar si presentarán algún cambio en su estabilidad a largo plazo, estructura física y propiedades mecánicas debido al método de esterilización usado [92].

Así, considerando la aplicación que se les pretende dar a las membranas de CS/PVA/ECH (como andamios celulares para la regeneración de cartílago auricular) es necesario someterlas a un proceso de esterilización.

Entre los métodos de esterilización de dispositivos e implantes médicos se encuentran: el óxido de etileno, el autoclave, el gas plasma, la radiación por luz ultravioleta, la radiación por haz de electrones y la radiación gama. La Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC y MR) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), lugar en el que se llevó a cabo la esterilización y caracterización biológica de los hidrogeles, cuenta con un autoclave y una cámara de radiación ultravioleta.

El uso del autoclave quedó descartado, pues es bien sabido que no es un método recomendable para la esterilización de polímeros, ya que su elevada temperatura de funcionamiento (121-134 °C) se encuentra por arriba de la temperatura de fusión ( $T_f$ ) de la mayoría de los polímeros, como es el caso del CS, cuya  $T_f$  es de ~118 °C [93].

Debido a lo anterior, se decidió esterilizar las membranas mediante radiación ultravioleta (UV). La esterilización se llevó a cabo en una cámara de radiación ultravioleta modelo UVC-500 (Hoefer Inc., EUA), Figura 2.1. El proceso de esterilización consistió en irradiar hidrogeles durante 40 minutos con luz ultravioleta a una longitud de onda  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Se ha reportado, que el proceso de irradiación con luz UV puede actuar como un mecanismo de entrecruzamiento o bien degradar las cadenas de los polímeros, alterando así sus propiedades mecánicas y estructurales [92, 94]. Con la finalidad de determinar posibles cambios en las propiedades mecánicas, estructurales y estabilidad a largo plazo de los hidrogeles tras el ciclo de esterilización, todas las pruebas desarrolladas en este trabajo, incluyen un grupo de control (CS/PVA/ECH) y un grupo de membranas esterilizadas (CS/PVA/ECH UV).

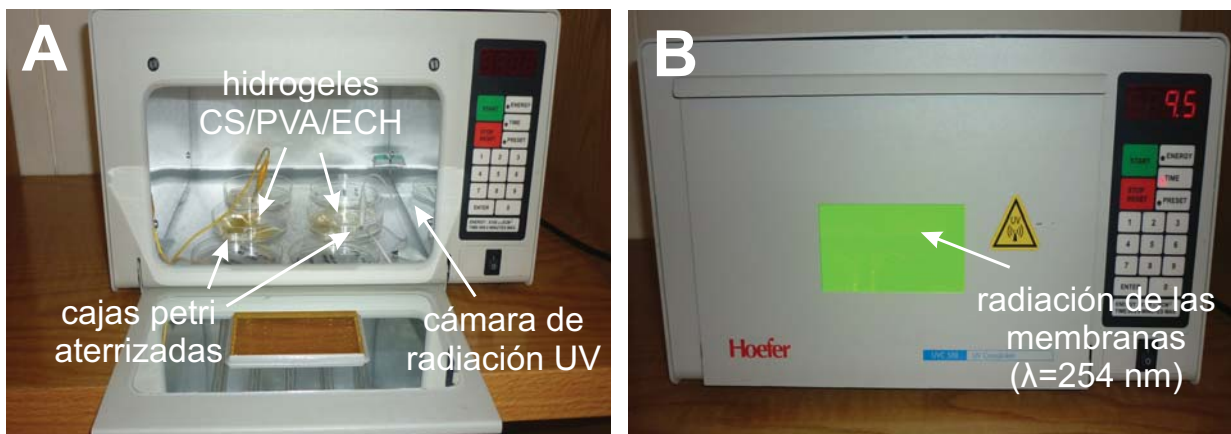


Figura 2.1: Proceso de esterilización de las membranas de CS/PVA/ECH mediante irradiación UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

## 2.2 Pruebas de hinchamiento

Un hidrogel es un material compuesto por un sólido (un polímero) y un líquido (agua o fluidos biológicos) de tal forma que sus propiedades finales, tanto mecánicas como biológicas, estarán definidas por la cantidad de líquido que sea capaz de retener en su red polimérica [60].

La absorción de líquido en los hidrogeles depende de ciertos factores, como: la naturaleza de la disolución en la que se encuentran inmersos, la estructura de la red polimérica, la presencia o ausencia de poros en el hidrogel y su densidad de entrecruzamiento. Así, las pruebas de hinchamiento son útiles para conocer la cinética de absorción de los hidrogeles; es decir, la cantidad de líquido que pueden almacenar en su red polimérica en función del tiempo. Además, de manera paralela, brindan un primer acercamiento para intuir la densidad de entrecruzamiento de la red.

El índice de hinchamiento de los hidrogeles de CS/PVA/ECH, se determinó empleando una disolución buffer fosfato salina (PBS, por sus siglas en inglés) a 37 °C, simulando un fluido biológico. Las membranas se cortaron en cuadros de 10 mm por lado (Figura 2.2 A) y se pesaron en la balanza analítica (Pioneer, OHAUS, EUA) antes de ser inmersas en la disolución de PBS (Figura 2.2 B). Un total de 10 muestras fueron estudiadas, 5 irradiadas con luz UV y 5 sin irradiar (CS/PVA/ECH UV y CS/PVA/ECH, respectivamente).

Posteriormente, todas las muestras fueron inmersas en PBS y puestas dentro de un baño de agua para mantener una temperatura constante de 37 °C (Figuras 2.2 C y 2.2 D). A predeterminados intervalos de tiempo, las muestras se retiraron del PBS y el líquido sobre su superficie fue cuidadosamente limpiado con papel filtro (Whatman, EUA) -Figura 2.2 E-. De esta manera, únicamente se considera el líquido atrapado en el interior de la red polimérica y no el líquido libre superficial que en realidad no aporta un hinchamiento a la red [60].

Las muestras nuevamente se pesaron en la balanza analítica (Figura 2.2 F) y después se regresaron al contenedor con PBS del que fueron retiradas.

Puesto que el peso, el volumen y las dimensiones del hidrogel cambian durante el proceso de hinchamiento, cualquiera de estos parámetros puede ser utilizado para caracterizar el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles. En este trabajo, el hinchamiento de las muestras se determinó mediante su cambio de peso, razón por la cual, se utilizó la ecuación (1) [58, 60].

$$Q (\%) = \frac{w_f - w_0}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde  $Q$  es el porcentaje de líquido atrapado en la red,  $w_f$  es el peso del polímero húmedo y  $w_0$  el peso del polímero húmedo, i.e. antes de ser sumergido en el PBS.

El pH de la disolución buffer se midió con un pH-metro (serie  $\Phi 340$ , Beckman Coulter, EUA) cada vez que las muestras eran extraídas para registrar su hinchamiento, por lo que la variación de pH respecto al tiempo también se estudió.

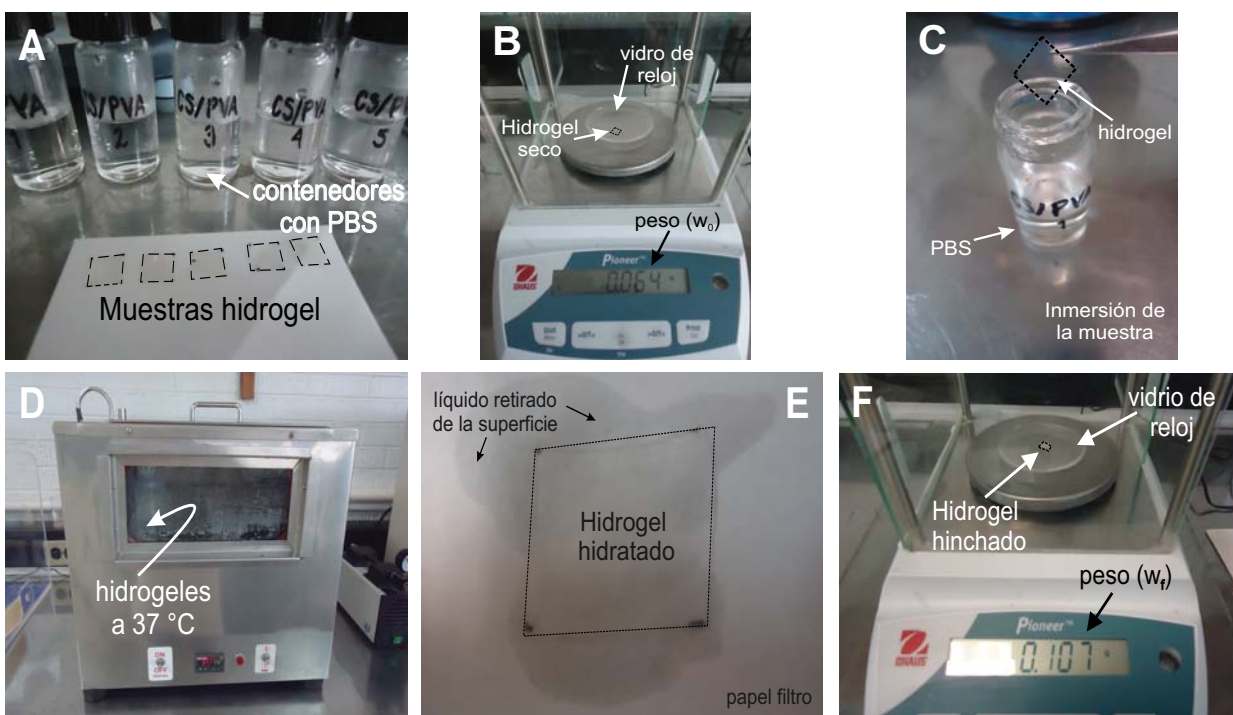


Figura 2.2: Desarrollo de la prueba de hinchamiento: A) Muestras de hidrogel de  $10 \text{ mm}^2$ , B) Pesaje de las muestras secas, C) Inmersión en PBS a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 7.4, D) Almacenamiento de las muestras en un baño de agua a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , E) A determinados intervalos de tiempo las muestras se retiran del frasco con PBS y el líquido superficial se limpia con papel filtro, F) Pesaje de las muestras tras el periodo de hinchamiento.

### 2.3 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica se llevó a cabo utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, resonancia magnética nuclear de protones y difracción de rayos X; en las siguientes subsecciones se abordan los detalles de cada una de las técnicas de caracterización empleadas.

### 2.3.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja ha sido ampliamente usada para estudiar la estructura molecular de polímeros, analizar grupos funcionales e identificar compuestos desconocidos. Esta técnica mide las frecuencias de radiación infrarroja absorbidas por las moléculas durante la vibración de una sustancia expuesta a este tipo de radiación [95].

Todas las moléculas poseen un movimiento vibracional, el cual, ocurre a valores cuantizados de energía. Las frecuencias de vibración de los diferentes enlaces en una molécula, dependen de la masa de los átomos involucrados y de la fuerza de unión entre ellos.

Para que sea posible la absorción de la energía infrarroja por parte de una sustancia, es necesario que la energía que incide sobre ella sea del mismo valor que la energía necesaria para que se dé una transición vibracional de sus moléculas [95]. Así, únicamente aparecerá una banda de absorción en el espectrograma de infrarrojo, cuando la frecuencia de la radiación incidente sobre la muestra sea la misma que la frecuencia de vibración de sus moléculas.

Es posible distinguir dos categorías básicas de vibración para describir el comportamiento de los polímeros: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión son originadas debido a cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) es más sensitiva a la estructura detallada de una molécula en comparación con la espectroscopía infrarroja tradicional.

Los dispositivos de FTIR utilizan un interferómetro que permite irradiar las muestras con todas las frecuencias del infrarrojo al mismo tiempo y medir la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda [95]. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual, muestra las longitudes de onda a las cuales la muestra absorbe el infrarrojo y permite una interpretación de los enlaces presentes.

En este trabajo, los hidrogeles sintetizados se caracterizaron mediante FTIR para identificar los grupos químicos presentes en el polímero, determinar la interacción entre los componentes de la mezcla (CS y PVA), confirmar el entrecruzamiento químico debido a la ECH y detectar la posible presencia de trazas sin reaccionar de ECH en las membranas.

La espectroscopía infrarroja se realizó en un espectrómetro FTIR (modelo Spectrum GX, Perkin-Elmer, EUA), equipado con un sistema de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando muestras de 100  $\mu\text{m}$  de espesor.

La espectroscopía de FTIR se realizó en el intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , llevándose a cabo 32 barridos. Los espectros obtenidos fueron normalizados y las bandas de mayor vibración se identificaron y asociaron con los grupos químicos correspondientes.

### **2.3.2 Resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ RMN)**

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es de gran importancia en la determinación de la microestructura de macromoléculas y compuestos orgánicos.

Un espectrómetro de RMN como el utilizado en este estudio, se compone básicamente de cuatro partes (Figura 2.3): un imán súper conductor, un transmisor de radiofrecuencias capaz de emitir frecuencias precisas, un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra y una computadora para registrar las señales que constituyen el espectro de RMN.

La RMN es una técnica espectroscópica que puede utilizarse únicamente para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones. Esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , los cuales presentan un momento magnético ( $\mu$ ) y son magnéticamente activos, debido a que poseen carga positiva en su núcleo [96].



Figura 2.3: Componentes del espectrómetro de RMN empleado en este estudio.

En ausencia de un campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético ( $B_0$ ) los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ . Mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$  (Figura 2.4).

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico se expone brevemente a una radiación electromagnética, a cierta frecuencia (conocida como frecuencia de resonancia) ocurre una transición en la que los núcleos en el estado de espín  $\alpha$  son promovidos al estado de espín  $\beta$ .

En el momento que los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre los estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de la muestra, siendo este el llamado espectro de RMN [97].

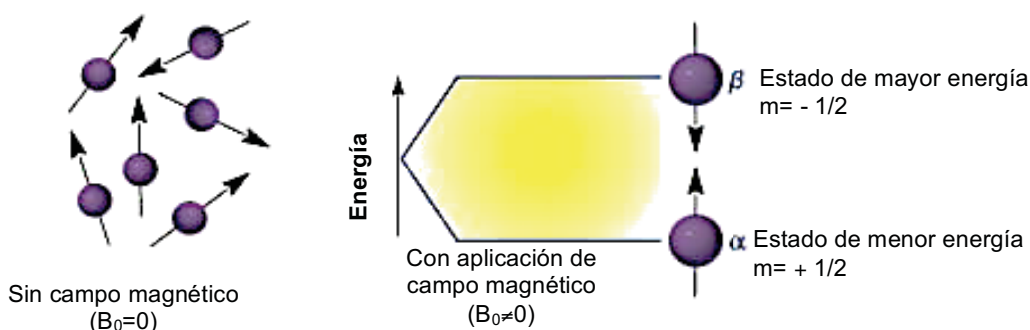


Figura 2.4: Niveles de energía de los núcleos bajo la acción de un campo magnético ( $B_0$ ). *Modificada de [98]*

Así, los espectros de resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$  RMN) consisten en un registro de las señales de resonancia correspondientes a los diferentes átomos de hidrógeno presentes en la muestra. La posición de cada señal permite determinar los elementos vecinos a los átomos de hidrógeno, mientras que su área es proporcional al número de protones presentes en la muestra.

Como se mencionó en la sección 1.6, la ECH es una molécula muy útil en el entrecruzamiento de hidrogeles; sin embargo, también es bien conocida su toxicidad [74]. Es por ello que para comprobar la presencia o ausencia de trazas de ECH (ECH sin reaccionar) en los hidrogeles de CS/PVA/ECH sintetizados, se realizó una espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN.

En esta prueba se analizó el agua residual empleada en los diversos ciclos de lavado que se les realizaron a los hidrogeles tras su síntesis. Se optó por usar esta muestra, debido a que la ECH es altamente soluble en agua y de haber restos de ECH en las membranas éstos deberían estar disueltos en el agua usada para lavar las membranas.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN fue adquirido usando un espectrómetro Avance 400 (Figura 2.3) operado a 400 MHz (Bruker, Suiza); se tomaron 128 barridos y se usó como referencia tetrametilsilano (TMS). Para el análisis se tomaron 30 mg del agua empleada durante los lavados de las membranas y se disolvieron en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).



### 2.3.3 Difracción de rayos X (DRX)

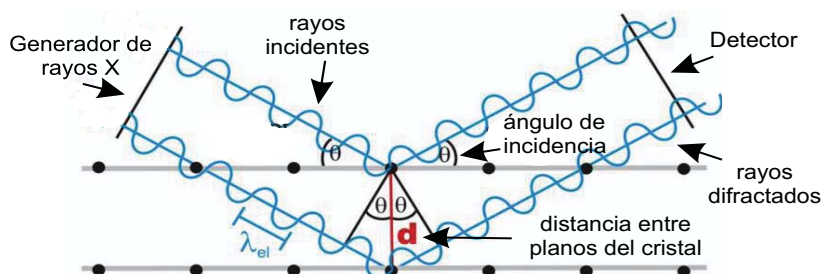


Figura 2.5: Esquema que describe el fenómeno de difracción de rayos X.

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica que nos permite determinar la existencia de regiones cristalinas en los hidrogeles, brindándonos resultados cuantitativos acerca de la proporción amorfa y cristalina presente.

El análisis de la fracción cristalina en los polímeros a menudo tiene una considerable importancia práctica, ya que un porcentaje de cristalinidad alto tiene el efecto de mejorar propiedades mecánicas tales como la resistencia a la tensión y la rigidez e incrementar su estabilidad a largo plazo retardando su disolución [99].

La difracción de rayos X consiste en enviar rayos X, con una longitud de onda conocida ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ , cuando se emplea un cátodo de Cu) hacia un material. Los rayos X emitidos golpean el material y solo aquellos que cumplen con la ley de Bragg son difractados hacia el detector (Figura 2.5). Matemáticamente la ley de Bragg se expresa conforme a la ecuación (2):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

donde  $n$  es un número entero llamado orden de difracción y corresponde al número de longitudes de onda entre los rayos difundidos por los planos atómicos adyacentes;  $\lambda$  se refiere a la longitud de onda de los rayos X,  $d$  es la distancia entre planos del cristal y  $\theta$  es el ángulo de incidencia del haz de rayos X [99, 100]. En este caso se considerará el primer orden de difracción ( $\therefore n=1$ ) debido a que los rayos X se propagan en el aire .

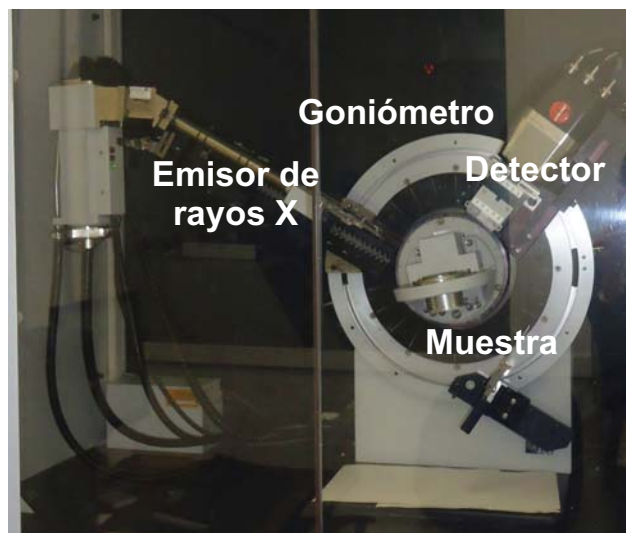


Figura 2.6: Difractómetro D8 Advance (Bruker) empleado durante las pruebas.

Los rayos X difractados son transformados en señales eléctricas para poder ser procesados por la computadora. Así, el análisis de los datos obtenidos genera un gráfico de la intensidad relativa en función del ángulo  $2\theta$ , el cual, se conoce como difractograma.

Para nuestro estudio de DRX se utilizó un difractómetro marca Bruker AXS modelo D8 Advance (Figura 2.6) equipado con un monocromador de grafito, radiación  $\text{CuK}\alpha$  con  $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$  y un filtro de níquel. Las pruebas se realizaron a 35 kV en un intervalo  $2\theta = 5^\circ - 70^\circ$ , un paso de  $0.02^\circ$  y una velocidad de  $0.4^\circ \text{ seg}^{-1}$ .

Esta técnica se utilizó para determinar el porcentaje de cristalinidad de las membranas de CS/PVA, CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV, así como de membranas hechas de los componentes individuales de la mezcla (CS y PVA).

El porcentaje de cristalinidad ( $C_r$ ) de las membranas se calculó a partir de los difractogramas obtenidos usando la ecuación (3) [101]:

$$C_r(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (3)$$

donde  $A_c$  y  $A_a$  corresponden al área bajo la curva de los picos cristalinos y las zonas amorfas, respectivamente. Dichas áreas fueron determinadas y medidas con el software Evaluation 11.0 del paquete Diffrac Plus 2005 de Bruker.

Los difractogramas del PVA fueron analizados tomando como base una celda unitaria monoclinica [24, 102, 103], mientras que para los difractogramas de CS se consideró una celda unitaria ortorrómbica [24, 64]. Los picos de cristalinidad obtenidos fueron confirmados e indexados de acuerdo con lo reportado en la literatura.

## 2.4 Desarrollo de la teoría elástica de los elastómeros

Es importante que las propiedades mecánicas de los hidrogeles sean medidas bajo condiciones lo más cercanas posibles a las del entorno en el que pretendan ser empleados, ya que su comportamiento mecánico dependerá en gran medida de dichas particularidades.

En estado hidratado la mayoría de los hidrogeles se comportan como elastómeros [35]. Los elastómeros son polímeros sólidos, amorfos e isótropos<sup>7</sup>, los cuales son capaces de presentar un alto grado de deformación ante pequeños esfuerzos. Su comportamiento esfuerzo-deformación es no lineal y por tanto no es posible aplicar la ley de Hooke para determinar su módulo elástico.

Cuando un hidrogel se encuentra en la región del comportamiento elastomérico, sus propiedades mecánicas dependen ampliamente de la arquitectura de su red polimérica [35, 58]. Con la finalidad de establecer una ecuación que relacione la estructura de la red polimérica y su comportamiento mecánico esfuerzo-deformación, se han empleado conceptos de termodinámica clásica, termodinámica estadística, mecánica de sólidos y algunos enfoques fenomenológicos.

Así, mediante la termodinámica clásica, es posible establecer una ecuación de estado que describa el comportamiento elástico de estos materiales. Para llegar a dicha ecuación es necesario tener presente que la deformación de los elastómeros se considera un proceso reversible, ya que al retirar el esfuerzo que actúa sobre ellos, son capaces de recobrar su configuración inicial sin que esto implique un gasto

---

<sup>7</sup> Material que presenta el mismo comportamiento mecánico en cualquier dirección.

de energía. De acuerdo con la termodinámica clásica el cambio en la energía interna de un proceso reversible está dado por la ecuación (4):

$$dU = TdS + dW \quad (4)$$

En donde  $dU$  es el cambio en energía interna,  $T$  la temperatura,  $dS$  es el cambio en la entropía y  $dW$  es el trabajo aplicado al sistema por fuerzas externas.

En elasticidad, el trabajo aplicado al sistema corresponde a un esfuerzo de tensión,  $f$ , el cual actúa sobre una muestra de longitud  $l$ ; por lo que el trabajo realizado para producir un pequeño desplazamiento es:

$$dW = fdl \quad (5)$$

Estrictamente, el trabajo aplicado sobre el sistema debería considerar de igual manera la presión atmosférica, por lo que  $dW = fdl - pdV$ ; sin embargo, como el cambio de volumen en los elastómeros es muy pequeño, su contribución al proceso de deformación puede ser despreciado frente a otros términos, por lo que  $dV = 0$ , considerándose de esta forma a los elastómeros como materiales incompresibles.

Generalmente, la deformación de la muestra se realiza a temperatura constante, por lo que se trata de un proceso reversible isotérmico. Por definición, en este tipo de procesos, el trabajo aplicado al sistema es igual a la energía libre de Helmholtz ( $A$ ):

$$dA = dW \quad (6)$$

Así, mediante las relaciones (5) y (6), la tensión ( $f$ ) puede ser expresada en la forma:

$$f = \left( \frac{\partial W}{\partial l} \right)_{T,V} = \left( \frac{\partial A}{\partial l} \right)_{T,V} \quad (7)$$

lo cual muestra que la fuerza de tensión es igual al cambio en la energía libre de Helmholtz por el incremento unitario de longitud de la muestra.

Al sustituir (6) en (4) y despejando de la expresión resultante  $dA$ , se obtiene la energía libre de Helmholtz para un cambio que toma lugar a  $T$  constante (9).

$$dU = TdS + dA \quad (8)$$

$$dA = dU - TdS \quad (9)$$

De esta manera, al combinar (7) y (9) es posible expresar la fuerza de tensión,  $f$ , como una contribución energética y una entrópica:

$$f = \left(\frac{\partial A}{\partial l}\right)_{T,V} = \left(\frac{\partial U}{\partial l}\right)_{T,V} - T \left(\frac{\partial S}{\partial l}\right)_{T,V} \quad (10)$$

El primer término, describe el cambio en la energía interna del sistema respecto al cambio de longitud de la muestra, mientras que la segunda contribución, es el producto de la temperatura absoluta y la relación de cambio de la entropía con un cambio de longitud.

En sólidos cristalinos, como los metales, la contribución energética es la dominante, ya que la energía interna del sistema se incrementa al deformar la red cristalina; sin embargo, en los elastómeros esto no sucede. Lo anterior se debe a que en estado no deformado, las cadenas poliméricas de los elastómeros se encuentran desordenadas y plegadas, pero al aplicar una fuerza de tensión sobre el material, estas se despliegan poco a poco y se orientan en dirección de la fuerza sin que ello involucre un cambio de longitud o ángulo entre los enlaces de sus moléculas, por lo que no hay una contribución energética a la deformación,  $\left(\frac{\partial U}{\partial l}\right)_{T,V} = 0$ , si no puramente entrópica.

Así, al reescribir (10) se obtiene la ecuación de elasticidad entrópica del polímero, la cual, queda expresada en la ecuación (11).

$$f = -T \left(\frac{\partial S}{\partial l}\right)_{T,V} \quad (11)$$

Haciendo uso de la termodinámica estadística y la ecuación de Boltzman, podemos expresar la elasticidad entrópica de los polímeros como la relación (12). Donde  $\kappa$  es la constante de Boltzman,  $r$  es la distancia entre los extremos de una cadena y  $\Omega(r, T)$  es la probabilidad de que una cadena polimérica con distancia  $r$  entre sus extremos adopte cierta conformación a una temperatura  $T$ .

$$f = -\kappa T \left( \frac{\partial \ln \Omega(r, T)}{\partial r} \right)_{T, V} \quad (12)$$

Cuanto mayor sea la distancia  $r$  entre los extremos de la cadena (i.e. entre más estirada se encuentre), el número de configuraciones que puede alcanzar es menor, y por ende su entropía configuracional también lo será.

Considerando una cadena lo suficientemente larga, bajo ciertas hipótesis y siendo  $r$  la distancia entre sus extremos, su función de probabilidad será:

$$\ln \Omega(r, T) = \frac{C}{\kappa} - \left( \frac{3r^2}{2r_f^2} \right) \quad (13)$$

Donde  $C$  es una constante y  $\overline{r_f^2}$  es la distancia media cuadrática entre los extremos de una cadena articulada libremente (sin restricciones en los ángulos de sus enlaces). Sustituyendo (13) en (12) y derivando respecto a  $r$ , se obtiene la ecuación (14) que describe la fuerza necesaria para alejar los extremos de la cadena una distancia  $r$ ; es decir, para deformarla.

$$f = -\kappa T \left[ \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{C}{\kappa} - \frac{3r^2}{2r_f^2} \right) \right]_{T, V}$$

$$\mathbf{f} = \frac{3\kappa T}{r_f^2} \mathbf{r} \quad (14)$$

Las redes poliméricas son únicas en su capacidad para deformarse reversiblemente varias veces su tamaño. De acuerdo con la expresión (14), su enorme capacidad de deformación surge de la elasticidad entrópica de las cadenas que conforman la red polimérica. El modelo más simple que captura esta idea de elasticidad es el *modelo de red afín* propuesto originalmente por Kuhn en 1936 [36].

La principal hipótesis del modelo de red afín es precisamente una deformación afín, es decir, plantea que la deformación sufrida por cada una de las cadenas poliméricas que conforman la red será igual a la deformación macroscópica del elastómero [36]. Así, mediante el modelo de red afín y ciertos formalismos de la mecánica de sólidos, es posible derivar una relación entre el módulo elástico y el peso molecular de las cadenas.

Para ello consideraremos una red elastomérica sin deformar de longitudes  $L_{x0}$ ,  $L_{y0}$  y  $L_{z0}$ . Si la red experimenta una deformación en las direcciones  $x$ ,  $y$  y  $z$  por los factores  $\lambda_x$ ,  $\lambda_y$  y  $\lambda_z$ , conocidos como razón de elongación, las dimensiones de la red una vez deformada serán:

$$L_x = \lambda_x L_{x0}$$

$$L_y = \lambda_y L_{y0}$$

$$L_z = \lambda_z L_{z0}$$

De acuerdo con el modelo de red afin, la posición de los extremos de las cadenas y/o los puntos de entrecruzamiento, se mueven durante la deformación como si estuvieran incorporados a un medio continuo elástico. Como resultado, los componentes de longitud de cada cadena cambian en la misma proporción que las dimensiones del volumen.

De este modo, si cada cadena posee un vector que describe la distancia entre sus extremos en estado no deformado,  $\vec{r}_0 = x_0 \hat{i} + y_0 \hat{j} + z_0 \hat{k}$ ; al aplicar una deformación,  $\lambda$ , el vector de la distancia entre extremos de la misma cadena por deformación afin será:

$$\vec{r} = \lambda_x x_0 \hat{i} + \lambda_y y_0 \hat{j} + \lambda_z z_0 \hat{k} \quad (15)$$

Recordando que  $W = f$  y combinando las relaciones (14) y (15), obtenemos:

$$W = \int_{\vec{r}_0}^{\vec{r}} f \, dr = \frac{3\kappa T}{r_f^2} \left( \int_{x_0}^{\lambda_x x_0} x dx + \int_{y_0}^{\lambda_y y_0} y dy + \int_{z_0}^{\lambda_z z_0} z dz \right) \quad (16)$$

Al integrar y evaluar la expresión (16) se obtiene el trabajo de deformación de una sola cadena de la red elastomérica, la cual queda expresada como:

$$W = \frac{3\kappa T}{2r_f^2} [x_0^2(\lambda_x^2 - 1) + y_0^2(\lambda_y^2 - 1) + z_0^2(\lambda_z^2 - 1)] \quad (17)$$

Sabiendo que la red elastomérica está formada por  $n$  cadenas y asumiendo que el trabajo total de deformación de la red ( $W_t$ ) está dado por la suma del trabajo de las cadenas individuales, la expresión (17) se reescribe como:

$$W_t = \frac{3\kappa T}{2r_f^2} [(\lambda_x^2 - 1) \sum_{i=0}^n (x_0^2)_i + (\lambda_y^2 - 1) \sum_{i=0}^n (y_0^2)_i + \lambda_z^2 (\lambda_z^2 - 1) \sum_{i=0}^n (z_0^2)_i] \quad (18)$$

Antes de que el elastómero sea deformado las cadenas se encuentran completamente orientadas al azar, por lo que no hay preferencia por una dirección y por lo tanto se cumple que el vector  $\vec{r}_0$ :

$$\sum_{i=0}^n (x_0^2)_i + \sum_{i=0}^n (y_0^2)_i + \sum_{i=0}^n (z_0^2)_i = \sum_{i=0}^n (\vec{r}_0^2)_i \quad (19)$$

Así, al considerar la expresión (19), la ecuación (18) toma la forma:

$$W_t = \frac{3\kappa T}{2r_f^2} \sum_{i=0}^n (\vec{r}_0^2)_i [\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2 - 3] \quad (20)$$

Debido a que el elastómero es un material isótropo, entonces:

$$\sum_{i=0}^n (x_0^2)_i = \sum_{i=0}^n (y_0^2)_i = \sum_{i=0}^n (z_0^2)_i = \frac{1}{3} \sum_{i=0}^n (r_0^2)_i \quad (21)$$

Además, por definición:

$$\sum_{i=0}^n (r_0^2)_i = N \overline{r_0^2} \quad (22)$$

Donde  $N$  es el número de cadenas por unidad de volumen presentes en la red y  $\overline{r_0^2}$  es la distancia media cuadrática entre los extremos de las cadenas en una red real. Al sustituir ambas condiciones en (20) obtenemos el trabajo total aplicado sobre la red, también conocido como la energía libre elásticamente almacenada:

$$W_t = \frac{N\kappa T}{2} \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} (\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2 - 3) \quad (23)$$



La cantidad  $\frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2}$  se denomina factor frontal y es la relación de la distancia media cuadrática entre los extremos de las cadenas en una red real ( $\overline{r_0^2}$ ) contra la distancia media cuadrática entre los extremos de cadenas articuladas libremente ( $r_f^2$ ). Dicho factor frontal frecuentemente se aproxima a 1, por lo que el trabajo de deformación puede quedar expresado como: [35]

$$W_t = \frac{N\kappa T}{2} (\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2 - 3) \quad (24)$$

Donde  $\lambda_i$  es la razón de deformación que sufre el material a lo largo de cada eje ( $\lambda_i = \varepsilon_i + 1$ ).

En una deformación uniaxial, como la estudiada en este trabajo, la red es estirada en una sola dirección (a lo largo del eje  $x$ ). Así, para deformaciones uniaxiales a volumen constante, las otras dos dimensiones de la red se ajustan para mantener el volumen constante de la muestra:

$$\begin{aligned} \lambda_x &= \lambda \\ \lambda_y &= \lambda_z = \frac{1}{\sqrt{\lambda}} \end{aligned} \quad (25)$$

Por lo que el cambio en la energía libre para una deformación uniaxial a volumen constante, se obtiene al sustituir las razones de deformación (25) en la ecuación (24):

$$W_t = \frac{NT\kappa}{2} \left( \lambda^2 + \frac{2}{\lambda} - 3 \right) \quad (26)$$

La única fuerza externa que actúa en dirección de la deformación es la tensión. Si  $\sigma$  es la magnitud de esa fuerza por unidad de área transversal, el trabajo necesario para incrementar la longitud de la muestra una cantidad  $dl$  es:

$$dW_t = \sigma dl = \sigma d\lambda$$

De esta manera:

$$\sigma = \frac{dW_t}{d\lambda} \quad (27)$$

De acuerdo con la relación (27) la fuerza requerida para deformar la red polimérica, es la razón de cambio de su energía libre respecto a su tamaño a lo largo del eje de deformación. Por lo que sustituyendo la relación (26),  $W_t$ , en (27) y derivando respecto a  $\lambda$  se obtiene:

$$\sigma = N\kappa T \left( \lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \quad (28)$$

La relación (28) se conoce como la ecuación constitutiva de los elastómeros bajo tensión uniaxial. Como se puede observar, esta ecuación relaciona el esfuerzo requerido para deformar la red con el número de cadenas elásticamente activas.

La relación (28) también puede ser escrita como:

$$\sigma = G \left( \lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \quad (29)$$

en donde:

$$G = N\kappa T$$

En ambas expresiones,  $G$  es el coeficiente equivalente al módulo de corte y puede ser expresado alternativamente en términos del peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{crl}$ ), la constante universal de los gases ( $R$ ), la temperatura ( $T$ ) y la concentración del polímero en la disolución ( $c$ ).

$$G = \frac{cRT}{M_{crl}} \quad (30)$$

Así, a partir de pruebas de tensión uniaxial y el empleo de la teoría elástica de los elastómeros aquí desarrollada, es posible caracterizar la propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles.

De las pruebas de tensión uniaxial, se obtiene el valor del módulo de corte,  $G$ , al graficar  $\sigma$  vs.  $\lambda - \frac{1}{\lambda^2}$ , siendo  $G$  la pendiente de la porción lineal de la curva resultante; tal como indicado por la ecuación (29).

Cabe resaltar que  $\lambda = \varepsilon + 1$ , donde  $\varepsilon$  es la deformación longitudinal de la muestra; típicamente calculada como  $\varepsilon = \frac{l-l_0}{l_0}$  donde  $l_0$  es la distancia inicial de la zona calibrada de una probeta de tensión uniaxial y  $l$  es el cambio en la distancia a distintos niveles de carga.

Una vez obtenido  $G$  y dado que los hidrogeles son considerados materiales isotropos e incompresibles, el módulo elástico,  $E$ , se puede conocer gracias a la relación entre las constantes elásticas  $G$  y  $E$ :

$$E = 2G(1 + \nu)$$

donde  $\nu$  es el coeficiente de Poisson y tiene un valor  $\sim 0.5$  para elastómeros, hidrogeles y materiales incompresibles. De esta forma:

$$E = 3G \quad (31)$$

También, conociendo el valor de  $G$  es posible calcular el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento de la red polimérica, para lo cual, únicamente es necesario despejar  $M_{crl}$  de la ecuación (30).

$$M_{crl} = \frac{cRT}{G} \quad (32)$$

Como se detallará más adelante, este parámetro permitirá calcular otra propiedad estructural de la red, conocido como el tamaño de poro o malla ( $D_N$ ).

## 2.5 Caracterización mecánica y estructural

En esta sección se describen las técnicas y el equipo empleado para evaluar la respuesta mecánica de los hidrogeles sometidos a tensión uniaxial. De igual forma se presentan las relaciones aplicadas para determinar los parámetros estructurales de la red polimérica a partir del comportamiento mecánico de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV.

### 2.5.1 Pruebas de tensión uniaxial

La prueba de tensión uniaxial es una prueba mecánica que sirve para determinar parámetros mecánicos importantes de los materiales. Dentro de estos parámetros se encuentra el módulo elástico, la deformación, el esfuerzo último a la ruptura (UTS, por sus siglas en inglés), la resiliencia, entre otros. El conocimiento de estos parámetros es esencial para el diseño y el éxito clínico de nuevos dispositivos biomédicos [81].

La prueba de tensión uniaxial, consiste en colocar una muestra de material con geometría y dimensiones bien definidas, entre dos mordazas y jalar el material por un extremo mientras que el otro se encuentra fijo. Los datos de la fuerza y el desplazamiento que sufre el material son adquiridos por una computadora. Con estos datos y la geometría de la muestra se puede trazar un gráfico de esfuerzo vs. deformación ( $\sigma$  vs.  $\varepsilon$ ) a través del cual, se determinan las propiedades mecánicas antes mencionadas.

El esfuerzo ( $\sigma$ ) es calculado como  $\sigma = \frac{f}{A_t}$ , donde  $f$  es la fuerza de tensión que se le aplica a la probeta para deformarla y  $A_t$  corresponde al área transversal de la misma, es decir, el área de la probeta que se ubica de forma perpendicular a la dirección de deformación o de aplicación de la fuerza. La deformación longitudinal de la muestra ( $\varepsilon$ ), como ya se estableció en la sección 2.4, se calcula como  $\varepsilon = \frac{l-l_0}{l_0}$ , donde  $l_0$  es la distancia inicial de la zona calibrada de la probeta de tensión uniaxial y  $l$  es el cambio en la distancia a distintos niveles de carga.

En las siguientes subsecciones se describe la geometría y preparación de las muestras, así como el equipo y los parámetros utilizados en las pruebas de tensión uniaxial a las que fueron sometidos los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV.

#### 2.5.1.1 Preparación de las muestras

Para seleccionar las muestras que se usarían en las pruebas mecánicas, se cortaron varias tiras rectangulares de las membranas CS/PVA/ECH y

CS/PVA/ECH UV. Las tiras se examinaron por microscopía óptica utilizando un microscopio invertido (Carl Zeiss Micro-Imaging, EUA).

Una vez que se corroboró la ausencia de defectos como burbujas, agujeros o cortes que pudieran alterar el comportamiento mecánico de los hidrogeles, las muestras se hidrataron con PBS y se mantuvieron a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se cortaron con un suaje especial en rectángulos de 60 x 20 mm (largo x ancho) y su espesor se midió en 3 diferentes puntos con un calibrador vernier digital (Mitutoyo, Japón) para obtener un promedio del espesor de las muestras.

Durante el ensayo de tensión uniaxial, se probaron cinco probetas rectangulares de cada uno de los hidrogeles antes mencionados ( $n=10$ ), mostrándose en los resultados únicamente las tres curvas más representativas de cada grupo (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV).

#### **2.5.1.2 Equipo y análisis mecánico**

Las pruebas de tensión uniaxial se llevaron a cabo en un dispositivo de carga axial servo hidráulico, MTS 858 MiniBionix, siguiendo los estándares D882-02 [104] y F2150-02 [105] de la American Society for Testing and Materials (ASTM). Se usó una celda de carga de 100 N para medir la fuerza aplicada durante la prueba de tensión uniaxial. La extensión, se midió con un sensor LVDT previamente calibrado con un lector de salida digital (IFD150HE, Mitutoyo). Para controlar el equipo MTS MiniBionix, se utilizó un controlador 407 MTS. Para la adquisición de datos se usó un chasis PXI-1002 de National Instruments con las tarjetas PXI 6281 y PXI 8331. En la Figura 2.7 A, se muestra el equipo MTS MiniBionix con cada uno de los componentes previamente descritos.

Las mordazas empleadas fueron diseñadas especialmente y fabricadas en acero inoxidable para sujetar firmemente muestras suaves (Figura 2.7 B); además, sobre las caras internas de las mordazas, se maquinaron unas marcas suaves para evitar el deslizamiento de la muestra durante la prueba [106].

Finalmente, se programó un instrumento virtual (VI, por sus siglas en inglés) en LabVIEW para sincronizar y grabar los datos de fuerza y desplazamiento con la computadora.

Las pruebas de tensión uniaxial se realizaron a 24 °C a una velocidad de deformación de 8.33 mm s<sup>-1</sup> y una distancia entre mordazas de 26 mm. Con los datos adquiridos de fuerza y desplazamiento y considerando que se trata de materiales con un comportamiento no lineal, se obtuvieron curvas de esfuerzo macroscópico como función de la razón de deformación,  $\sigma$  vs  $\lambda - \frac{1}{\lambda^2}$ , para cada muestra; donde  $\sigma$  es el esfuerzo aplicado por área transversal de la probeta,  $\lambda = \varepsilon + 1$  y  $\varepsilon$  es la deformación longitudinal de la muestra, como se explicó anteriormente.

El módulo de corte ( $G$ ) se calculó en la región lineal de estas curvas mediante una regresión lineal. Finalmente, tomando en cuenta que los hidrogeles pueden ser considerados materiales incompresibles<sup>8</sup>, fue posible conocer su módulo elástico o módulo de Young ( $E$ ) al emplear la relación (31),  $E = 3G$  [31, 87, 107, 108].

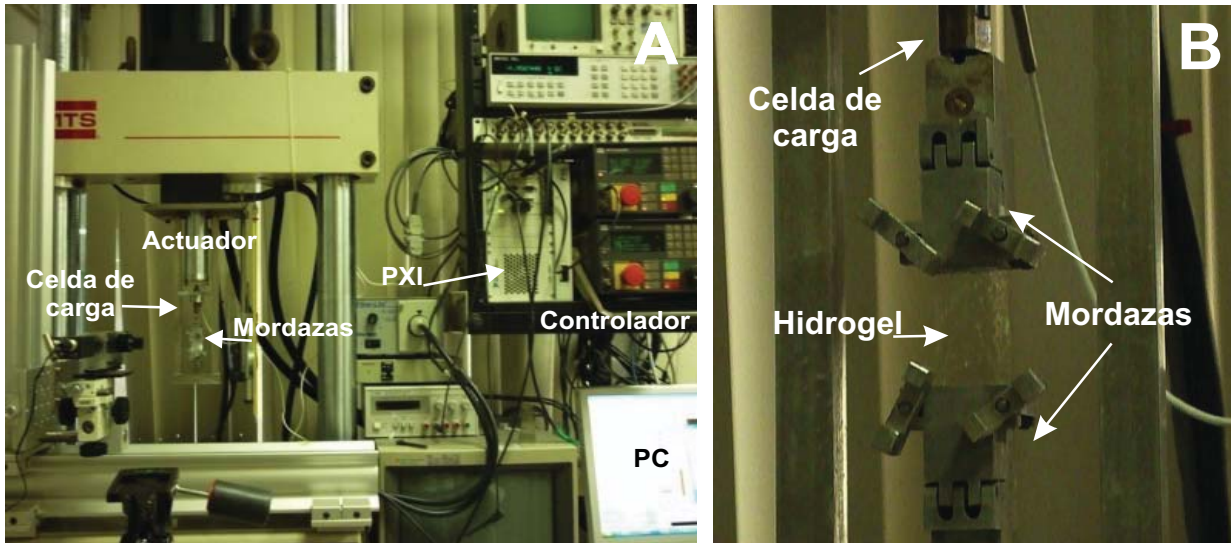


Figura 2.7: Equipo para pruebas de tensión uniaxial. A) Componentes del dispositivo de carga uniaxial, B) Mordazas para la sujeción de muestras suaves.

<sup>8</sup> En los elastómeros, el cambio de volumen ante un esfuerzo de tensión es muy pequeño ( $dV \approx 0$ ), por lo que su contribución al proceso de deformación puede ser despreciado frente a otros términos, considerando así al material como incompresible.

## 2.5.2 Propiedades Estructurales

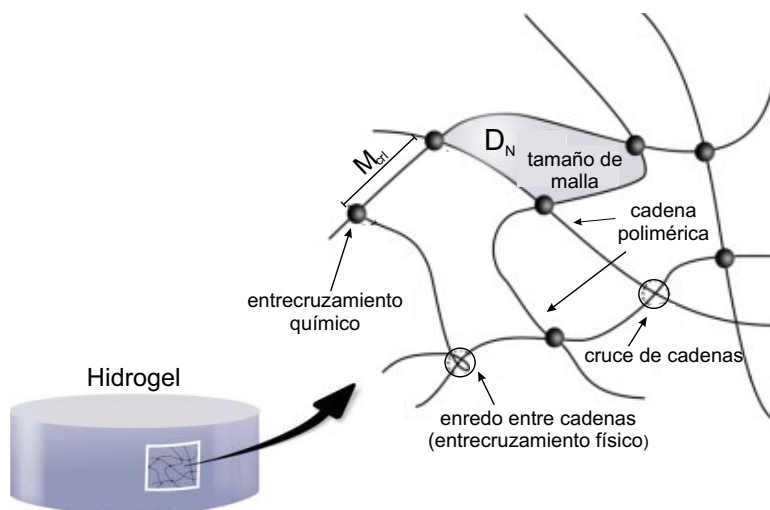


Figura 2.8: Representación esquemática de los parámetros estructurales de la red polimérica de los hidrogeles

El comportamiento mecánico de los hidrogeles puede ser definido por tres parámetros estructurales de su red polimérica (Figura 2.8): el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{cr1}$ ); la longitud de correlación ( $D_N$ ), también conocida como el tamaño de poro o malla; y la fracción volumétrica al equilibrio en estado hidratado ( $v_s$ ) [109, 110].

De acuerdo con lo desarrollado en la sección 2.4 es posible analizar la estructura polimérica de los hidrogeles mediante el uso de diversas teorías que describen su comportamiento mecánico. Así, el módulo de corte ( $G$ ) puede ser usado para conocer las propiedades estructurales de la red polimérica [111].

El peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{cr1}$ ) se define como el peso promedio de las cadenas poliméricas que conforman la red (Figura 2.8), entendiendo que una cadena es aquella sección de monómeros comprendidos entre dos puntos de entrecruzamiento. Este parámetro fue determinado en la sección 2.4 y se calcula a través de la ecuación (32) [23, 87].

$$M_{cr1} = \frac{cRT}{G} \quad (32)$$

Donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura en *Kelvin* a la cual el módulo de corte fue determinado ( $296.15 \text{ K}$ ) y  $c$  es

la concentración, en  $\text{g m}^{-3}$ , de CS y PVA en la disolución entrecruzada.

La concentración ( $c$ ) se puede definir como la relación entre la cantidad de soluto (gramos de CS y PVA) y la cantidad de disolvente (volumen de disolución CS/PVA/ECH). De este modo,  $c=47800 \text{ g m}^{-3}$ , ya que en los 250 mL ( $0.00025 \text{ m}^3$ ) de disolución CS/PVA/ECH que se usaron para preparar las membranas, había 3.56 g de CS y 8.39 g de PVA (11.95 g de soluto en total).

D'Errico et al. [110] mostraron que el tamaño de malla ( $D_N$ ) puede ser calculado mediante el “*modelo equivalente de la red*” usando la ecuación (33) [112]. El  $D_N$  es un indicativo de la distancia promedio entre puntos de entrecruzamiento (Figura 2.8). De acuerdo con la ecuación (33),  $D_N$  puede ser fácilmente determinado si la concentración ( $c$ ) y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{crl}$ ) se conocen:

$$D_N = \sqrt[3]{\frac{6M_{crl}}{\pi c A}} \quad (33)$$

en donde  $A$  es el número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ).

Finalmente, la fracción volumétrica al equilibrio del polímero en estado hidratado ( $v_s$ ) se calcula usando los resultados obtenidos durante las pruebas de hinchamiento realizadas previamente. Así, la relación de hinchamiento al equilibrio ( $Q_e$ ) es inversamente proporcional a la fracción volumétrica,  $v_s$ , por lo que [113]:

$$v_s = Q_e^{-1} \quad (34)$$

Un factor estructural más que puede ser determinado, es la densidad de entrecruzamiento teórica ( $\varphi_c$ ), es decir, el número de cadenas presentes por unidad de volumen. De acuerdo con Treloar [36],  $\varphi_c$  se puede calcular mediante la expresión (35):

$$\varphi_c = \frac{c}{M_{crl}} \quad (35)$$

en donde  $c$  es la concentración y  $M_{crl}$  es el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento.



## 2.6 Caracterización biológica

La caracterización biológica de las membranas se llevó a cabo en la unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC y MR) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). En esta sección se presentan las técnicas empleadas para evaluar la respuesta biológica de los hidrogeles y los detalles sobre el aislamiento y cultivo *in vitro* de las células empleadas.

### 2.6.1 Aislamiento y cultivo *in vitro* de condrocitos auriculares

Los condrocitos empleados en la caracterización biológica de los hidrogeles se obtuvieron del cartílago auricular de conejos Nueva Zelanda de 2 meses de edad. Las ventajas del conejo como modelo experimental frente a otros animales frecuentemente usados, como el cerdo o los ratones, incluyen: bajo costo, fácil disponibilidad, requerimientos mínimos de vivienda y particularmente para este estudio, la presencia de una gran cantidad de cartílago en las orejas, el cual, puede ser fácilmente extraído mediante hidrodisección.

La hidrodisección del cartílago auricular de los conejos, se realizó inyectando lentamente disolución salina entre la piel y el cartílago de la oreja hasta que ambos tejidos se separaron (Figura 2.9 A). Posteriormente, con unas pinzas de disección se retiró la piel que recubría el cartílago (Figura 2.9 B); una vez que el cartílago auricular quedó expuesto, cuidadosamente con la ayuda de un bisturí, se removió el pericondrio aún adherido al cartílago (Figura 2.9 C). Una vez que el cartílago auricular quedó completamente limpio (Figura 2.9 D) se almacenó en PBS hasta que se llevó a cabo su digestión<sup>9</sup> mecánico-enzimática.

Este proceso se realizó en ambas orejas y se llevó a cabo conforme a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, NOM 062-ZOO-1994.

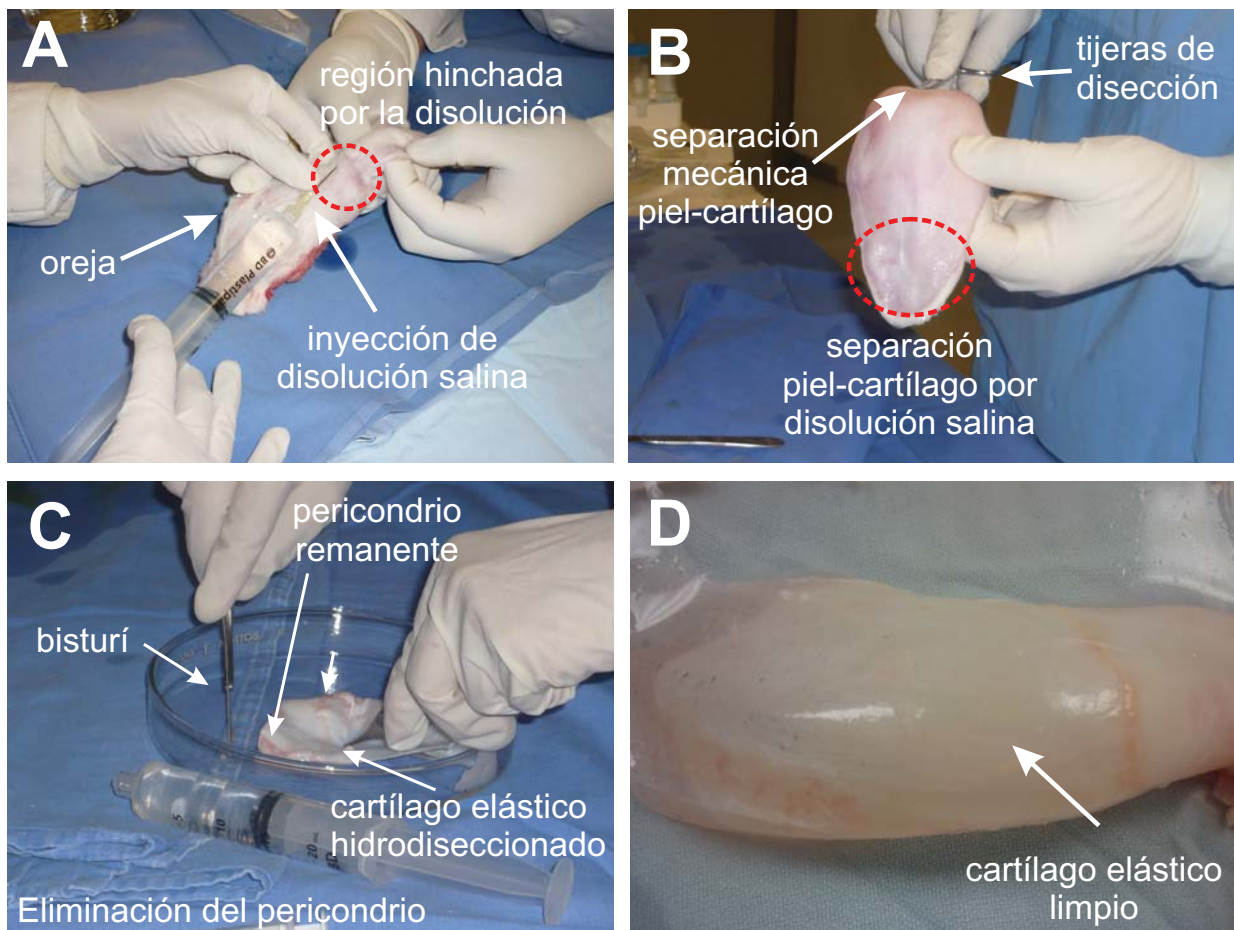
Tras la hidrodisección, el cartílago obtenido se lavó dos veces con PBS (Gibco, EUA) y 10% de antibiótico/antimicótico, a continuación, se digirió mecánica y

---

<sup>9</sup> Procedimiento que permite la disgregación de las células del tejido del cual forman parte.

enzimáticamente con 0.3% de colagenasa tipo II (AC-3, ICN Biomedicals, EUA) a 37 °C por 18 horas. La suspensión celular resultante se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 100 µm (Falcon, BectonDickinson, EUA) para separar los fragmentos de cartílago que no lograron ser digeridos. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante<sup>10</sup> resultante se aspiró y el pellet celular que se formó se resuspendió en 15 mL de medio de cultivo DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco, EUA) con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, BRL/Life Technologies, EUA).



*Figura 2.9: Hidrodissección del cartílago auricular de conejo. A) Inyección de la disolución salina para separar la piel del cartílago, B) La piel se retira con la ayuda de unas pinzas de disección C) El pericondrio remanente se elimina cuidadosamente del cartílago con un bisturí, D) Cartílago elástico auricular limpio y listo para su digestión mecánica y enzimática.*

<sup>10</sup> Fase líquida superior que permanece tras la formación de un precipitado celular (pellet) después de centrifugar la muestra.

Finalmente, los condrocitos se sembraron sobre cajas petri a una densidad de 32,787 células  $\text{cm}^{-2}$  en un área de 63  $\text{cm}^2$ . Los cultivos celulares se mantuvieron en monocapa a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 12 días. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana.

Mediante un microscopio invertido (Carl Zeiss, Alemania) se monitoreó el crecimiento celular y la ausencia de contaminación bacteriana.

### 2.6.2 Formación de constructos

Una vez que los condrocitos cultivados de manera *in vitro* formaron una monocapa y alcanzaron cerca del 100% de confluencia<sup>11</sup>, los cultivos se tripsinizaron<sup>12</sup> (tripsina-EDTA, Sigma, EUA) y las células se contaron para posteriormente sembrarlas sobre las membranas de CS/PVA/ECH UV; formando así los constructos<sup>13</sup> que más adelante darán lugar al nuevo cartílago.

Para ello, 10 muestras de 1  $\text{cm}^2$  de las membranas de CS/PVA/ECH se lavaron primero con agua destilada, luego con PBS y por último con medio de cultivo DMEM/F-12 con la finalidad de ajustar el pH de las membranas y barrer cualquier componente tóxico de ECH que hubiera quedado sin reaccionar durante la síntesis polimérica. Después, conforme a lo descrito en la sección 2.1.4, las membranas se esterilizaron mediante radiación UV durante 40 minutos en la cámara ultravioleta UVC-500 (Hoefer, EUA).

Tras su esterilización, las membranas de CS/PVA/ECH UV se sembraron con condrocitos auriculares a una densidad de  $2 \times 10^5$  células  $\text{cm}^{-2}$ . Para ello, las membranas se colocaron en cajas de 6 pozos (1 membrana por pozo) y sobre la superficie de los hidrogeles se depositó 1 mL de la disolución con células que se obtuvo de la tripsinización de las monocapas para tener la densidad de sembrado deseada ( $2 \times 10^5$  células  $\text{cm}^{-2}$ ). Los constructos se dejaron reposar durante 2 minutos

---

<sup>11</sup> Fase en la que las células del cultivo ocupan toda la superficie disponible inhibiendo su división debido al contacto que existe entre sí.

<sup>12</sup> Procedimiento a través del cual, mediante una enzima (tripsina), se desprenden las células de la superficie a la que se encuentran adheridas con la finalidad de transferirlas a otras superficies.

<sup>13</sup> Un constructo es la estructura que resulta de la asociación de las células y el biomaterial empleado como andamio en la construcción de un tejido artificial mediante ingeniería de tejidos.

en una incubadora a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> para que los hidrogeles absorbieran la mayor cantidad de disolución. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de medio de cultivo DMEM/F-12 a cada pozo y se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

Los constructos se mantuvieron bajo condiciones estándar *in vitro* durante 10 días, cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

### **2.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental**

Con la finalidad de observar la distribución de los condrocitos sobre el andamio y determinar si sintetizaron MEC tras 10 días de cultivo *in vitro*, los constructos se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés).

Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental FEI XL30 (Philips, EUA) aplicando vacío y electrones retrodispersados con 15 - 20 kV.

En este estudio se observaron cinco constructos, los cuales se lavaron previamente con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Posteriormente, los constructos se incubaron durante 15 minutos a 37 °C; transcurrido este tiempo, el paraformaldehído se retiró y las muestras nuevamente se lavaron con PBS y se colocaron en un pozo nuevo para llevarlas a ESEM.

### **2.6.4 Prueba de viabilidad celular**

La viabilidad celular de los hidrogeles se estudió usando calceína-AM y homodímero de etidio (kit L-3224, VIVO/MUERTO, viabilidad/citotoxicidad; Molecular Probes, EUA). Esta prueba determina simultáneamente las células vivas y las células muertas midiendo dos parámetros conocidos. Si se detecta actividad de esterasas intracelulares, la calceína-AM emite fluorescencia verde (~515 nm) al excitarse a 490 nm, indicando así células viables. En cambio, si las células están muertas, habrá pérdida de la membrana plasmática y el homodímero de etidio podrá entrar en contacto con los ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (~635 nm) al excitarse a 490 nm.

Para esta prueba se utilizaron 5 de los constructos cultivados de forma *in vitro* durante 10 días. A estos constructos se les colocó 0.1  $\mu\text{L}$  del kit de calceína-AM y homodímero de etídio y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Después, los constructos se lavaron con PBS durante 5 minutos y se fijaron con una disolución al 4% de paraformaldehído. Finalmente, se observaron en el microscopio óptico con fluorescencia Carl Zeiss Imager A1 (Gottingen, Alemania).

### 2.6.5 Prueba de citotoxicidad

La prueba con bromuro de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazolio (MTT Formazán, Kit M2003, Sigma), conocida simplemente como prueba de MTT, se usó para evaluar la citotoxicidad de los condrocitos sembrados sobre membranas de CS/PVA/ECH UV. Esta prueba se basa en la reducción de sales amarillas de tetrazolio a cristales púrpuras de formazán. Dicha reducción, es debida a la deshidrogenación del tetrazolio por las enzimas secretadas en la mitocondria de las células metabólicamente activas [114].

Para realizar esta prueba, se cortaron 80 fragmentos de 0.32  $\text{cm}^2$  de las membranas de CS/PVA/ECH UV y se lavaron con PBS y DMEM-F12. Posteriormente, las muestras se colocaron en 8 cajas de 96 pozos (10 muestras por caja) y sobre las membranas se sembraron condrocitos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células  $\text{cm}^{-2}$  y se cultivaron durante 10 días a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad relativa.

Dentro de los 10 días de cultivo *in vitro*, a determinados intervalos de tiempo<sup>14</sup> se fueron sacando una a una las cajas y se les realizó la prueba de MTT. Para ello, se le añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la disolución de MTT a cada pozo y la caja se incubó durante 4 horas a 37 °C y 95% de humedad relativa. Posteriormente, el medio de cultivo con MTT se removió y las muestras se lavaron con PBS y medio de cultivo fresco. En cada uno de los pozos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución reveladora de DMSO (dimetilsulfóxido):isopropanol (1:1) y se incubaron bajo condiciones estándar *in vitro*

---

<sup>14</sup> Intervalos: 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días (el día 0 corresponde a 1 hora de cultivo). En cada uno de estos intervalos una de las cajas se retiró del cultivo *in vitro* y se le realizó la prueba de MTT.

durante toda la noche para disolver los cristales de formazán que se formaron. Al día siguiente, la disolución reveladora se resuspendió varias veces con ayuda de una micropipeta y se pasó a un pozo nuevo. Para estimar la concentración de formazán, la absorbancia de la disolución obtenida se midió a 620 nm con un espectrofotómetro (Beckman Coulter, EUA).

Para propósitos de comparación, en todas las mediciones se usaron membranas de CS/PVA/ECH UV sin células como control negativo y como control positivo condrocitos auriculares cultivados *in vitro*. Ambos grupos recibieron el mismo tratamiento que los constructos para el desarrollo del ensayo de MTT.

Con la finalidad de obtener una relación directa entre la intensidad de la absorbancia leída con el espectrofotómetro y el número de células vivas sobre los constructos y/o en los pozos de cultivo (controles positivos), se realizó la calibración del espectrofotómetro. Así, será posible conocer la proliferación de los condrocitos sobre las membranas de CS/PVA/ECH UV.

Para calibrar el espectrofotómetro, se colocaron cantidades conocidas de células<sup>15</sup> en los pozos de cultivo y se siguió el protocolo de MTT previamente descrito haciendo la lectura de todos los pozos el mismo día. Con los resultados obtenidos, se trazó un gráfico de número de células vs. absorbancia a 620 nm. Posteriormente, en el software Mathematica v8 (Wolfram Research, EUA) se realizó el ajuste de los datos experimentales. Así, mediante la ecuación resultante del ajuste, es posible relacionar de manera directa la absorbancia leída, con el número de células viables.

Una vez que se conoció esta relación, se trazó un gráfico de proliferación celular y otro de velocidad de proliferación, conociendo de este modo el número de células vivas presentes en los constructos a lo largo del tiempo de cultivo y la velocidad a la que se están replicando, respectivamente.

---

<sup>15</sup> Densidad de sembrado: 5 000, 10 000, 20 000, 40 000, 80 000 y 160 000 células por pozo

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Reacción de entrecruzamiento y síntesis de los hidrogeles

En esta sección se presenta la reacción de entrecruzamiento que se lleva a cabo entre la ECH y la mezcla CS/PVA durante la síntesis de los hidrogeles. Además, se propone la estructura molecular de la red polimérica de CS/PVA/ECH que se forma tras el entrecruzamiento. Aunque el objetivo de este trabajo de tesis no consiste en profundizar en el mecanismo y la cinética de esta reacción, es importante conocer la forma en que la ECH interacciona con las cadenas poliméricas de CS y PVA con la finalidad de evitar trazas de ECH en los hidrogeles.

En ciertas aplicaciones (i.e. como andamios celulares o como membranas de filtración) los hidrogeles no solo necesitan ser estables en ambientes húmedos, sino también ser resistentes a una combinación de esfuerzos químicos y mecánicos, por lo que es necesario estabilizarlos mediante el entrecruzamiento de su red polimérica [33]. Los entrecruzantes, son moléculas bifuncionales de bajo peso molecular que estabilizan a los hidrogeles a través de enlaces covalentes entre los grupos funcionales presentes en las cadenas.

La ECH fue seleccionada como agente entrecruzante de la mezcla CS/PVA debido a que no elimina la función catiónica de las aminas primarias ( $-NH_2$ ) del CS gracias a su capacidad para reaccionar tanto con los grupos hidroxilo ( $-OH$ ) del CS y del PVA como con los  $-NH_2$  del CS, permitiendo así, una mayor funcionalidad química en la red polimérica resultante.

De acuerdo con Zheng et. al. [101], la ECH puede reaccionar con los grupos amino y/o hidroxilo dependiendo de la temperatura y el pH de la disolución en la que se realiza el entrecruzamiento. Así, a  $pH \leq 7$  y/o temperaturas por debajo de los  $40\text{ }^\circ\text{C}$  existe preferencia por los grupos amino; mientras que a temperaturas superiores a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  y/o pH básico, la reacción puede llevarse a cabo tanto en los

grupos  $\text{-NH}_2$  como en los  $\text{-OH}$ , formando de esta manera una red densamente entrecruzada [33, 101, 115].

Conforme a lo detallado en la sección 2.1.3, el entrecruzamiento de la mezcla CS/PVA se realizó a  $\sim 40^\circ\text{C}$ , por lo que es muy probable que la ECH haya reaccionado tanto con los grupos  $\text{-OH}$  y  $\text{-NH}_2$  del CS como con los  $\text{-OH}$  del PVA.

La ECH es un epóxido organoclorado que posee un anillo oxirano en su estructura, el cual, es altamente reactivo debido a la tensión angular<sup>16</sup> presente entre los carbonos del anillo [116]. Debido a ello, los enlaces del oxirano son débiles y pueden ser atacados fácilmente por un nucleófilo<sup>17</sup> ocasionando la escisión (ruptura) del anillo. Así, el ataque nucleofílico al anillo oxirano, también llamado anillo epóxido, es la base para iniciar la reacción de entrecruzamiento en nuestro sistema CS/PVA. Esta reacción puede ser desencadenada por las aminas primarias del CS y por los grupos hidroxilo del CS y PVA durante el entrecruzamiento de la mezcla.

La reacción de entrecruzamiento de la ECH con los grupos  $\text{-NH}_2$  del CS se representa esquemáticamente en la Figura 3.1. Como se puede observar, la reacción ocurre en 4 etapas. En la primera etapa se da la apertura del anillo oxirano de la ECH debido al ataque nucleofílico de la amina primaria del CS. El par de electrones libres que posee la amina le permite formar un enlace covalente con la ECH, generándose así una adición nucleofílica. Así, la apertura del anillo oxirano resulta en la formación de grupos hidroxilo, mientras que la reacción de adición genera una amina secundaria ( $\text{-NH}$ ). De esta manera en la segunda etapa, el CS tiene unido a su anillo glucosídico nuevos grupos:  $\text{-NH}$ ,  $\text{-OH}$  y cloro ( $\text{Cl}$ ).

En la tercera etapa, el átomo de  $\text{Cl}$  es desplazado por el par de electrones libres de la amina primaria ( $\text{-NH}_2$ ) de otra cadena polimérica de CS, generándose una sustitución nucleofílica, donde el grupo saliente es el  $\text{Cl}$  en forma de ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). La amina primaria de la cadena sustituyente queda cargada positivamente ( $\text{-NH}_2^+$ ), por lo que el ión  $\text{Cl}^-$  extrae un protón ( $\text{H}^+$ ) de ésta, neutralizando la cadena y obteniéndose el producto final (Figura 3.1).

<sup>16</sup> Pobre superposición de los orbitales atómicos de los carbonos en los compuestos orgánicos saturados. La poca superposición de los orbitales  $\text{sp}^3$  se debe a la desviación de los enlaces respecto a los ángulos ideales ( $109^\circ$ ). En el anillo oxirano de la ECH el ángulo entre carbonos es de  $60^\circ$ .

<sup>17</sup> Moléculas con pares de electrones no compartidos que pueden cederlos a átomos deficientes de electrones, combinándose y enlazándose covalentemente con ellos.



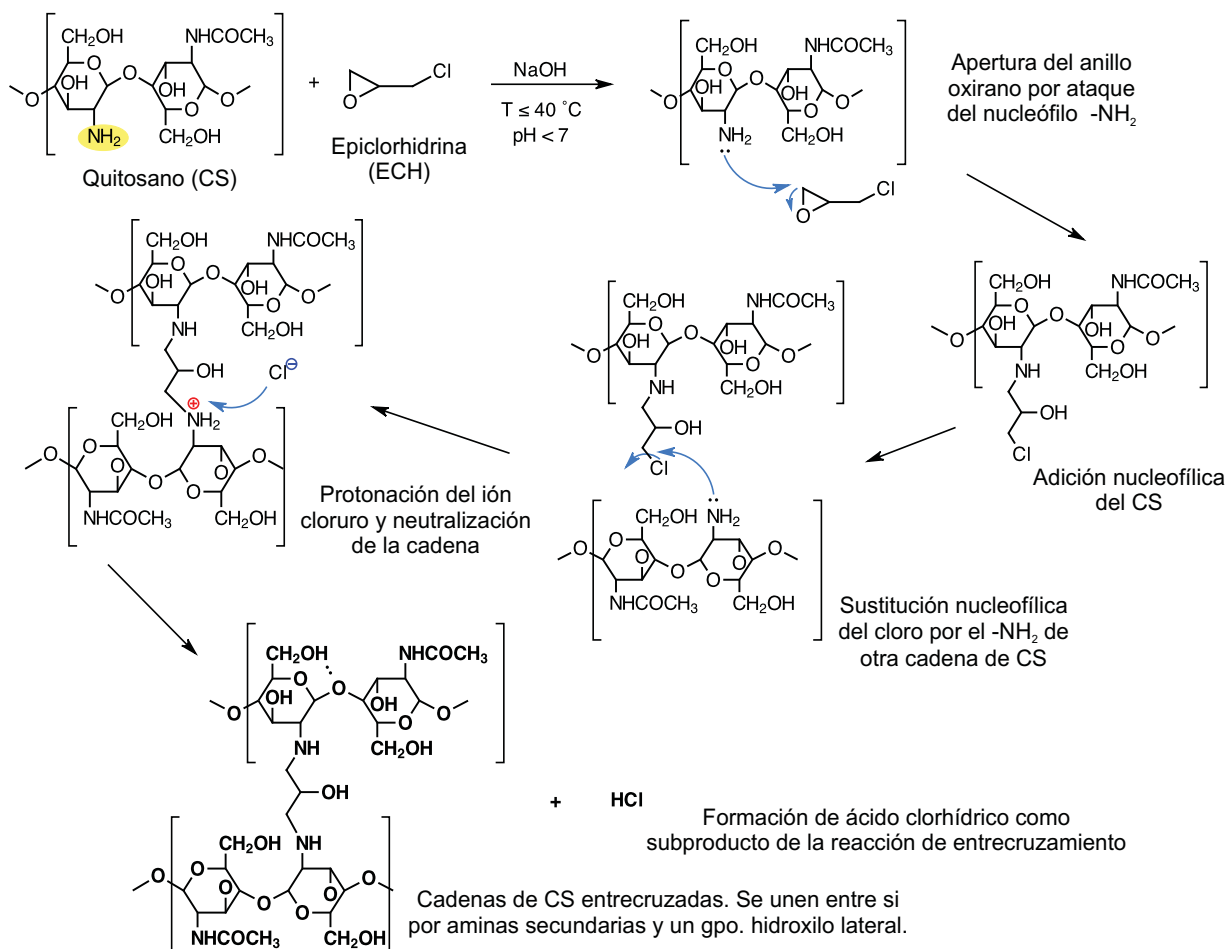


Figura 3.1: Mecanismo de la reacción de entrecruzamiento entre las cadenas de quitosano (CS) y la epiclorhidrina (ECH) a través de las aminas primarias ( $-\text{NH}_2$ ) del CS.

De esta forma, el entrecruzamiento del CS con ECH a través de los grupos amino primarios, resulta en la unión de las cadenas de CS mediante aminas secundarias y grupos hidroxilo, así como en la formación de ácido clorhídrico (HCl) como subproducto [33, 72, 115, 117]. La estructura molecular de las cadenas de CS entrecruzadas mediante sus aminas primarias se presenta al final de la reacción en la Figura 3.1.

El mecanismo de entrecruzamiento de la ECH mediante los grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) del CS se representa en la Figura 3.2, en esta reacción se obtiene la formación de éteres ( $\text{R}-\text{O}-\text{R}$ ) y nuevos grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ), los cuales unen a las cadenas poliméricas de CS. De acuerdo con Zheng et. al. [101] y Austero et. al. [33], esta reacción tiene lugar cuando la temperatura de la disolución es mayor a  $40^\circ\text{C}$ .

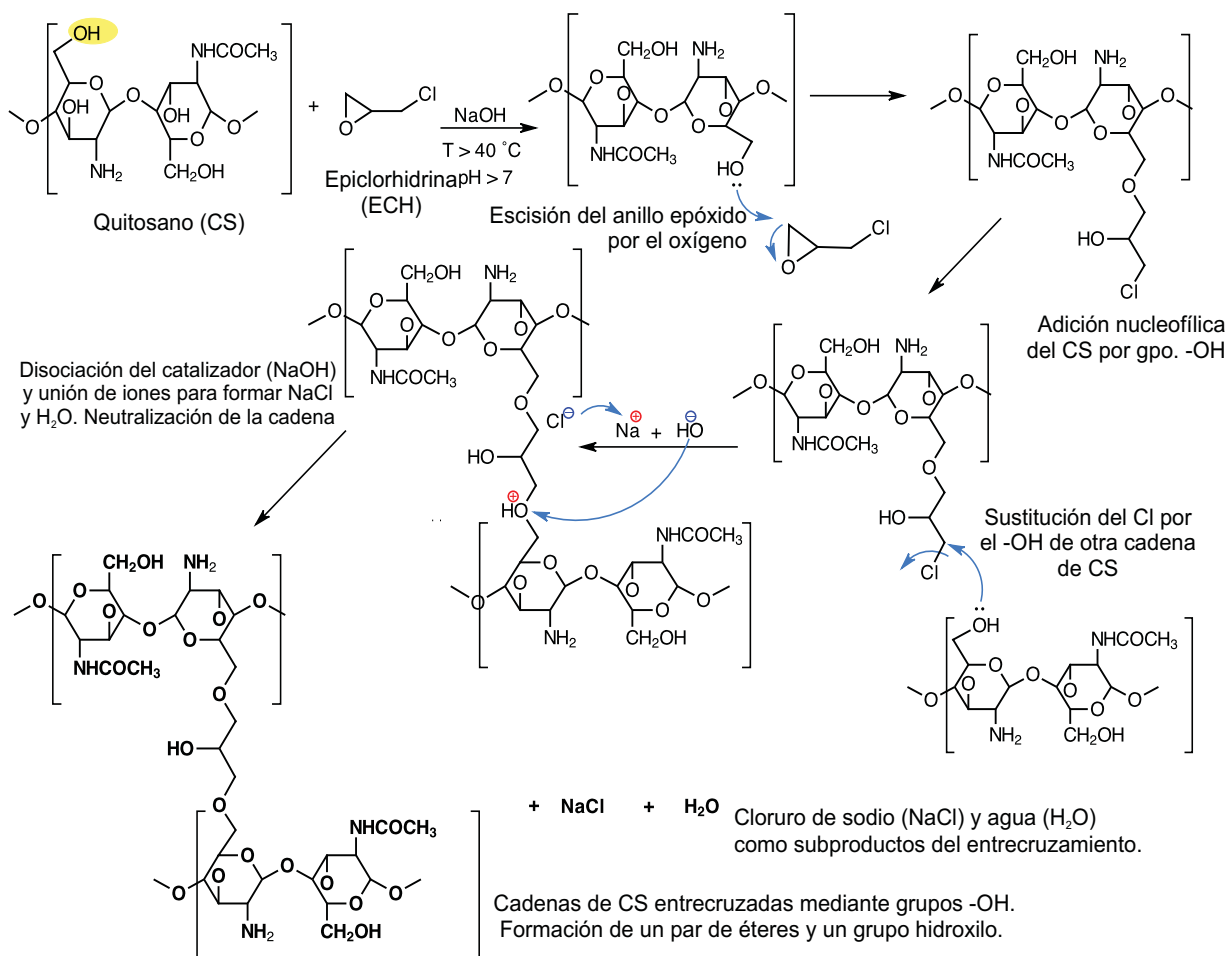


Figura 3.2: Mecanismo de la reacción de entrecruzamiento entre las cadenas de quitosano (CS) y la epíclorhidrina (ECH) a través de los grupos hidroxilo (-OH) del CS.

El mecanismo de reacción consta básicamente de los mismos pasos que la reacción amina-epóxido. De esta forma, la reacción se inicia con la escisión heterolítica del anillo epóxido debido al ataque nucleofílico del oxígeno unido al carbono seis del CS, que de manera similar a las aminas, posee pares de electrones sin compartir y puede enlazarse covalentemente con la ECH, generando así una adición nucleofílica. Posteriormente, se produce una sustitución nucleofílica, en donde el Cl de la nueva cadena lateral del CS es desplazado por el -OH de otra cadena de CS. El Cl saliente forma un ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) y ambas cadenas quedan unidas por dos grupos éteres (R-O-R).

El hidróxido de sodio (NaOH) que se añadió como catalizador a la reacción (sección 2.1.3) se disocia en iones Na<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup>. El ion OH<sup>-</sup> del NaOH extrae el H<sup>+</sup> del

éter protonado ( $R-OH^+-R$ ) neutralizando así a la nueva molécula y obteniendo agua ( $H_2O$ ) como subproducto. Por otro lado, el ión  $Na^+$  se une al ión  $Cl^-$  desplazado durante la sustitución nucleofílica para generar cloruro de sodio ( $NaCl$ ). La estructura molecular de las cadenas de CS entrecruzadas por los grupos hidroxilo con ECH y los subproductos de esta reacción se muestran en la Figura 3.2.

Las cadenas poliméricas de PVA, igual que las de CS, pueden ser entrecruzadas por la ECH a través de los grupos hidroxilo ( $-OH$ ) presentes en su cadena principal. En la Figura 3.3 se muestra dicha reacción de entrecruzamiento. El mecanismo de la reacción del PVA es equivalente a la reacción del CS cuando es entrecruzado por la ECH a través de sus grupos  $-OH$ .

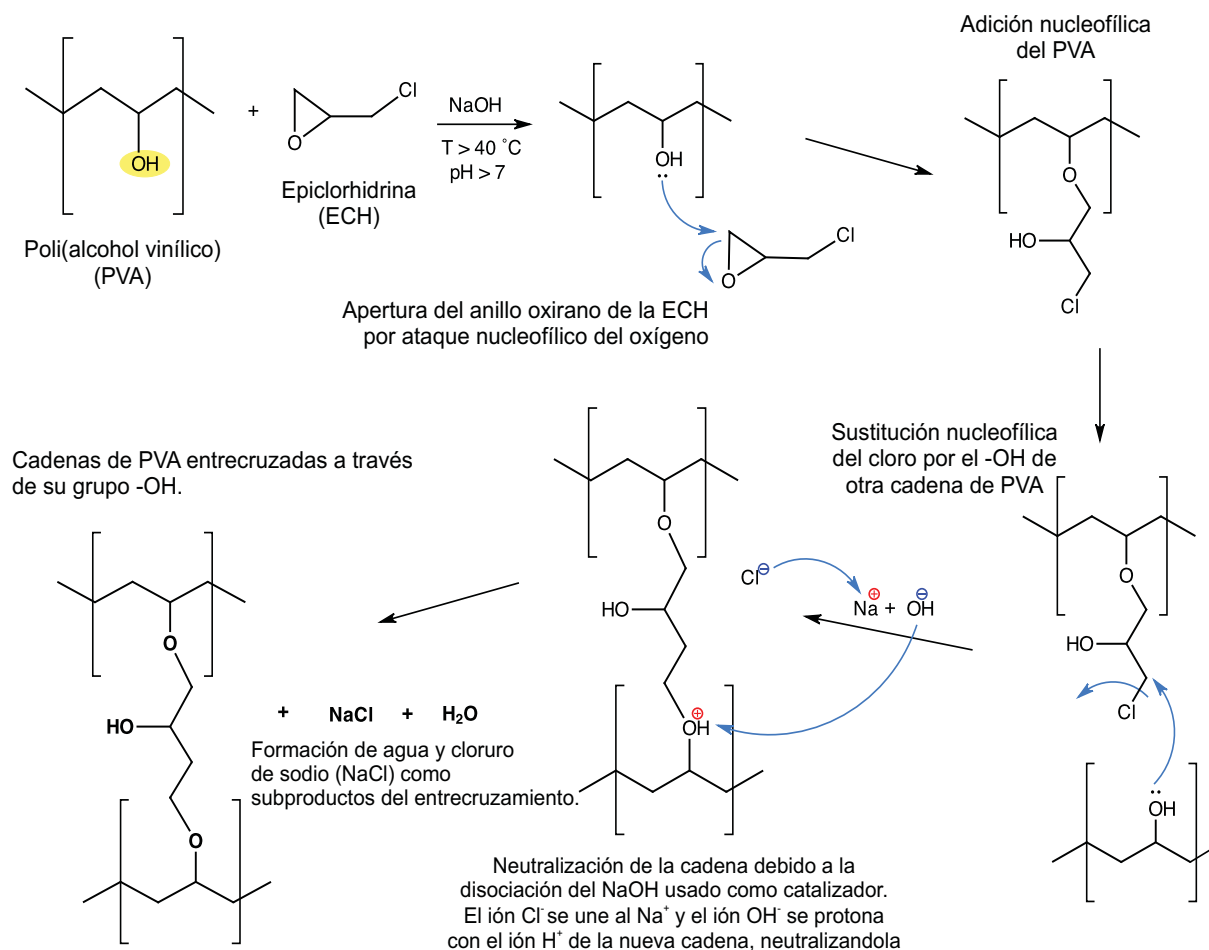


Figura 3.3: Mecanismo de la reacción de entrecruzamiento entre la epiclorhidrina (ECH) y las cadenas de poli(alcohol vinílico) (PVA) a través de los grupos hidroxilo ( $-OH$ ).I

En todas las reacciones presentadas anteriormente, por cada molécula de ECH se consumen dos monómeros de CS y/o PVA, por lo que el entrecruzamiento de las cadenas continuará hasta que las moléculas de ECH se agoten; esto debido a que la ECH es el reactivo que se encuentra en menor proporción dentro de la mezcla (0.25 % v/v).

Conociendo los mecanismos de reacción y teniendo presente que el entrecruzamiento de la mezcla CS/PVA se pudo presentar tanto en los grupos amino del CS como en los hidroxilo del CS y PVA, en la Figura 3.4 se representa la estructura molecular propuesta para la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH sintetizados en este trabajo de tesis. En esta estructura molecular se pueden presentar cinco tipos de enlaces en diferentes proporciones:

1. Cadenas de CS unidas entre sí debido al entrecruzamiento de sus grupos amino (Figura 3.4, recuadro azul).
2. Cadenas de CS unidas por el entrecruzamiento de sus grupos hidroxilo (Figura 3.4, recuadro verde).
3. Cadenas de PVA entrecruzadas con ECH mediante sus grupos hidroxilo (Figura 3.4, recuadro morado).
4. Cadenas de CS y cadenas de PVA unidas entre sí por el entrecruzamiento de sus respectivos grupos -OH (Figura 3.4, recuadro rojo).
5. Puentes de hidrógenos intermoleculares (entre moléculas de CS y/o PVA) e intramoleculares (dentro de las moléculas de una misma cadena polimérica) entre los átomo de N, O e H de la red polimérica (Figura 3.4, líneas punteadas).

El enlace entre cadenas que se espera tener en mayor proporción es el correspondiente a la reacción del CS mediante sus grupos amino (Figura 3.4 A, recuadro azul). Lo anterior se debe a que la reacción de eterificación de los grupos -OH es mucho más lenta y únicamente llega a ser significativa cuando las aminas están lo suficientemente reducidas [72, 118].

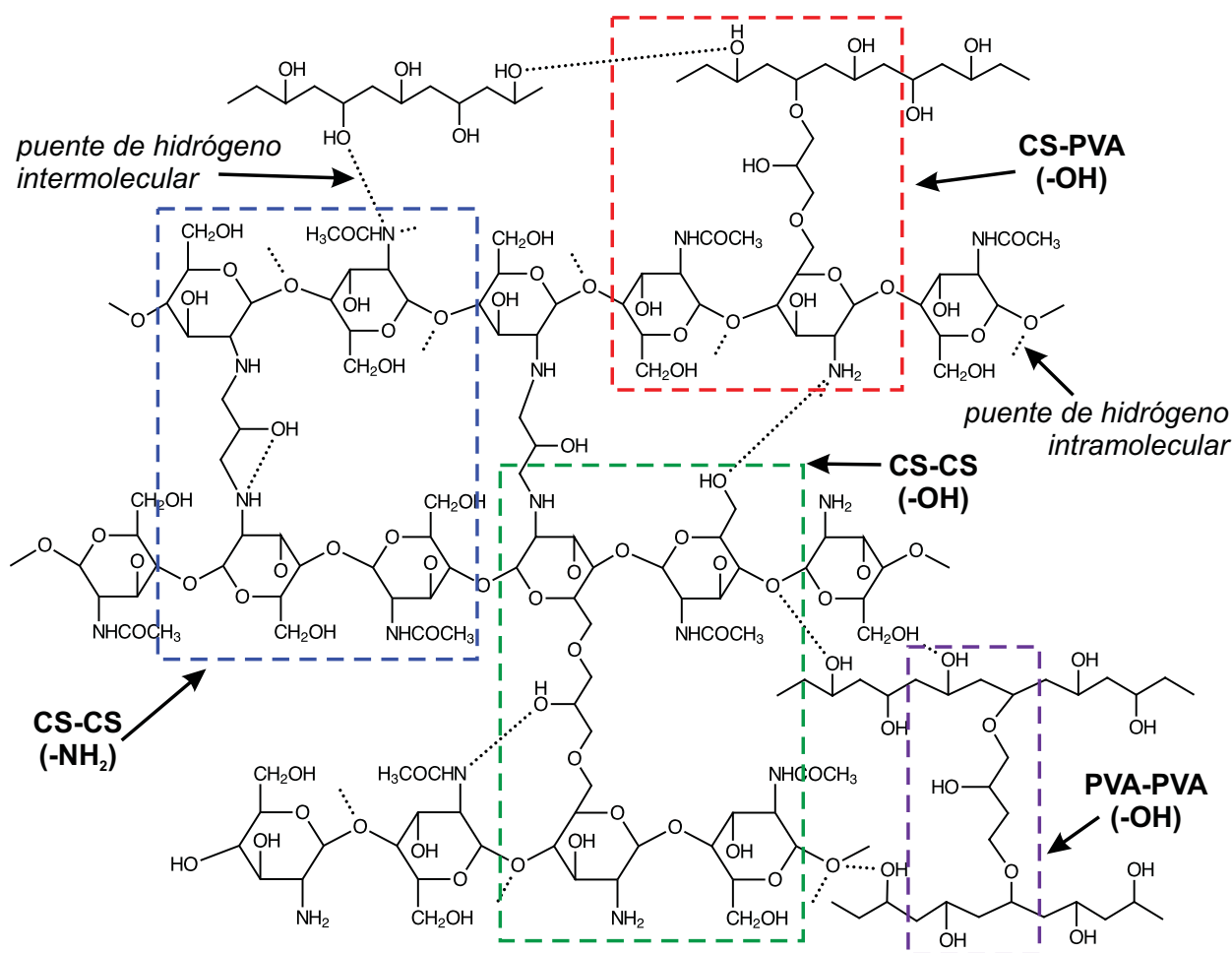


Figura 3.4: Estructura molecular propuesta para la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH. En ella se consideran todas las interacciones moleculares que se pueden presentar durante el entrecruzamiento químico de la mezcla CS/PVA con ECH: A) unión de CS por sus grupos  $-NH_2$  (recuadro azul), B) unión de CS por grupos  $-OH$  (recuadro verde), C) enlaces de PVA-PVA por sus grupos  $-OH$  (recuadro morado), D) unión CS-PVA mediante sus respectivos grupos  $-OH$  (recuadro rojo), y formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (líneas punteadas).

Aunque la formación de algunos de estos enlaces y grupos sustituyentes pueden ser comprobados mediante espectroscopía infrarroja, se considera necesario realizar un estudio más profundo que permita corroborar la estructura molecular de la red polimérica propuesta. Para ello, se propone estudiar los hidrogeles de CS/PVA/ECH mediante  $^1H$  RMN y  $^{13}C$  RMN (resonancia magnética nuclear de protones y de carbono, respectivamente) ya que la correlación homonuclear y heteronuclear de los espectros permitiría determinar la estructura molecular y el arreglo espacial de la red polimérica.

Una vez que la mezcla CS/PVA se entrecruzó con ECH, las disoluciones se colocó en cajas petri, las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente para evaporar los disolventes empleados y propiciar la formación de las membranas.

Las membranas de CS/PVA/ECH se formaron después de 72 horas, tuvieron un espesor promedio de  $0.17 \pm 0.040$  mm y un diámetro de 90 mm (Figura 3.5).

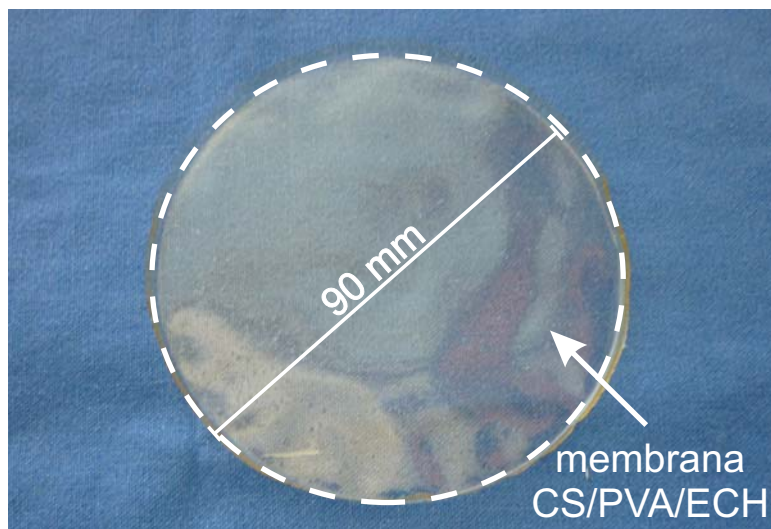


Figura 3.5: Fotografía de una de las membranas sintetizadas de CS/PVA/ECH.

### 3.2 Pruebas de hinchamiento

Los hidrogeles usualmente presentan un comportamiento altamente hidrófilo, siendo ésta una característica importante en este tipo de materiales. De tal forma que, como se mencionó en la sección 2.2, la cantidad de líquido que son capaces de absorber se encuentra directamente relacionada con su comportamiento mecánico.

En la Figura 3.6 A, se muestra el porcentaje de absorción de líquido de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV en función del tiempo. A lo largo del experimento, también se registró el cambio en el pH de la disolución en la cual se sumergieron las muestras, encontrándose que el pH promedio a lo largo de la prueba fue de  $7.20 \pm 0.07$  (Figura 3.6 B).

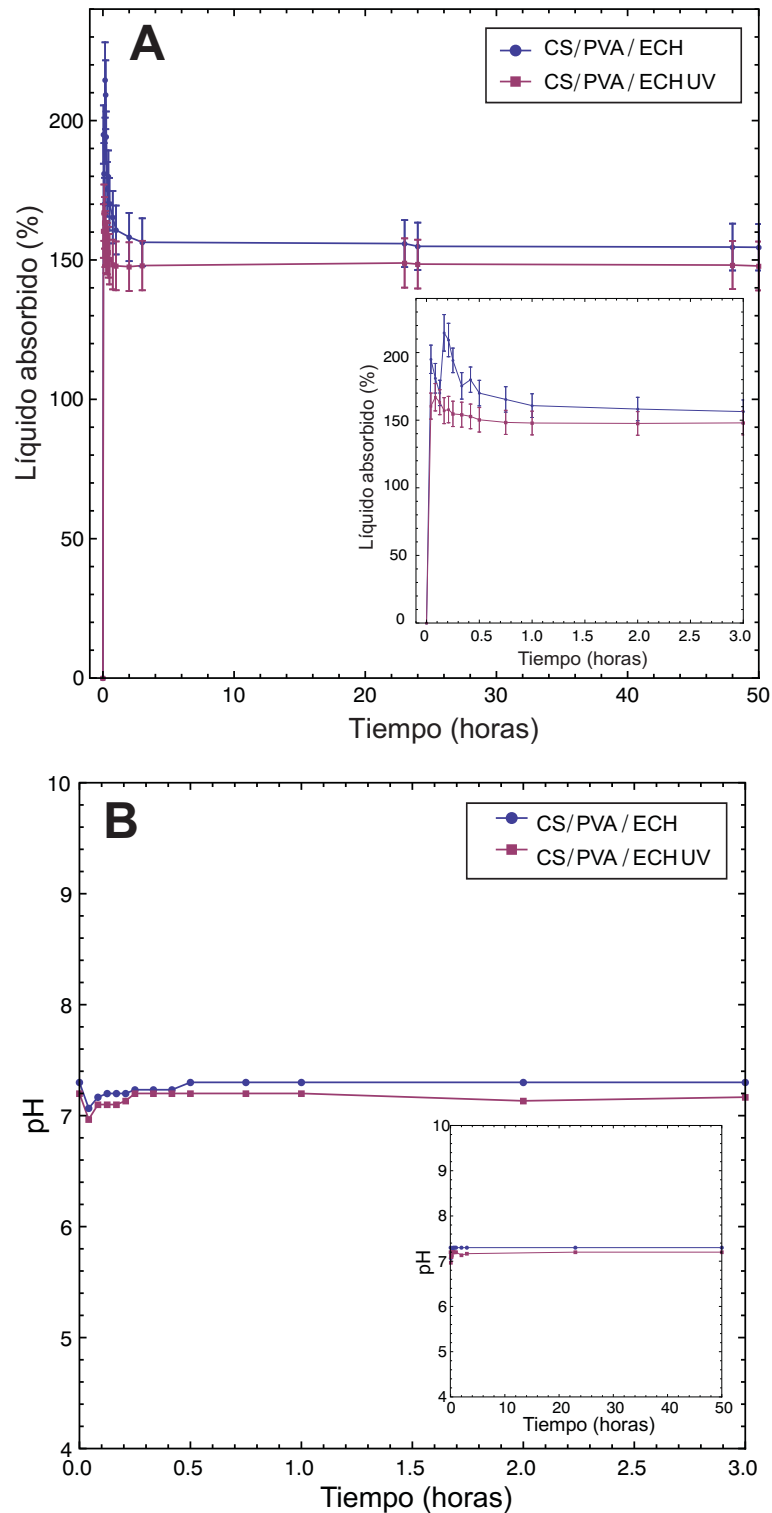


Figura 3.6: Comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV. A) Curva de absorción de líquido de los hidrogeles de CH/PVA/ECH (puntos) y CS/PVA/ECH UV (cuadros). En el recuadro interno se muestra a detalle la cinética de absorción de ambos grupos de muestras durante las primeras tres horas de hinchamiento. B) Cambio de pH en función del tiempo de la disolución de PBS en la que se colocaron los hidrogeles. En la gráfica principal se aprecia el cambio de pH durante las primeras tres horas de hinchamiento, mientras que en el recuadro, se encuentra graficado el pH de la disolución de PBS durante toda la prueba (50 horas).

La curva de absorción de líquido en función del tiempo (Figura 3.6 A), describe la velocidad de absorción de fluido por el hidrogel. En esta gráfica, se pueden observar cambios drásticos que ocurren durante la primera hora para ambos materiales. Las membranas de CS/PVA/ECH alcanzaron la máxima absorción a los 10 minutos con un porcentaje de hinchamiento de 214%. En cambio, las membranas irradiadas con UV alcanzaron su máxima absorción a los 5 minutos, siendo ésta de 167%. Tras este periodo crítico, la absorción de ambos polímeros disminuyó hasta alcanzar el equilibrio ( $Q_e$ ) alrededor de 156% y 148% respectivamente.

La diferencia en el hinchamiento entre ambos grupos de hidrogeles, puede deberse a un entrecruzamiento adicional en la red polimérica de las membranas esterilizadas por radiación UV. La presencia de este fenómeno también se ha reportado en otras investigaciones [92, 94, 110, 119].

De esta manera, la radiación UV pudo haber generado radicales libres en las cadenas poliméricas de CS y PVA. Estos radicales, al ser altamente reactivos, dieron lugar a nuevos puntos de entrecruzamiento, formando así, una red más rígida y con poros más pequeños que obstaculizan la entrada de moléculas. Debido a ello, el porcentaje de hinchamiento alcanzado por las membranas de CS/PVA/ECH UV es menor que el de las membranas sin esterilizar.

Así, la radiación UV juega una doble función en nuestros hidrogeles, como agente esterilizador y como fotoentrecruzante. El incremento en la densidad de entrecruzamiento debido a la luz UV, es corroborado y determinado cuantitativamente más adelante, i.e. cuando se estudien las propiedades estructurales de las membranas.

Otro fenómeno interesante que presentaron los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV, fue el efecto de sobrerrespuesta, conocido en inglés como *overshooting*. Este efecto, se caracteriza por un comportamiento súper absorbente durante los primeros minutos de hinchamiento, siendo en este punto donde se presenta la máxima absorción de líquido; posteriormente se observa un deshinchamiento gradual del hidrogel hasta alcanzar el equilibrio [120].

La sobrerrespuesta al hinchamiento de los hidrogeles de CS/PVA/ECH puede ser bien explicado por el equilibrio de hinchamiento de Donnan, el cual, se basa en el



gradiente de presión osmótica dentro y fuera del hidrogel, debido a las cargas electrostáticas y a la concentración de contra-iones que se forman dentro del hidrogel. A medida que el hidrogel se hincha y las cadenas poliméricas se desenredan y se expanden, la presión osmótica disminuye; sin embargo, la fuerza de contracción elástica de la red entrecruzada, aumenta. Con el tiempo, ambas fuerzas se equilibran entre sí y se alcanza el equilibrio de hinchamiento [121-123].

Además, los hidrogeles de CS/PVA/ECH poseen grupos iónicos (grupos amino del CS) que pueden ser protonados y desprotonados dependiendo del pH de la disolución en que se encuentren; estos grupos poseen un  $pK_b \approx 6.4$  [123, 124]. En un medio acuoso con pH 7 ( $> pK_b$ ) como el PBS, el CS presenta una baja densidad de carga, por lo que casi todos sus grupos  $-NH_2$  están desprotonados y eventualmente pueden formar puentes de hidrógeno.

Así, el comportamiento de hinchamiento de la red polimérica está influenciado únicamente por un gradiente de presión osmótica; sin embargo, como el fluido entra en la red, los grupos  $-NH_2$  del CS y los  $-OH$  del PVA y CS forman puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares (Figura 3.4); con lo que la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica se incrementa y produce una contracción de sí misma. De esta manera, parte del líquido que había sido previamente absorbido es ahora expulsado hasta que un nuevo estado de equilibrio se alcanza.

La curva de pH como función del tiempo (Figura 3.6 B) muestra un decremento en el pH del PBS durante los primeros minutos de inmersión de las membranas en la disolución. Esto debido a la liberación de ácido acético durante los primeros 10 minutos. Las moléculas de ácido acético liberadas, habrían quedado atrapadas en la red una vez que las membranas se formaron. La presencia de ácido acético también fue detectada por  $^1H$  RMN.

### 3.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Las Figuras 3.7 y 3.8 muestran los espectros de FTIR de los polímeros puros y su mezcla; en la Figura 3.7 se observan los espectros correspondientes al CS, PVA y ECH, mientras que la mezclas CS/PVA, CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV aparecen en la Figura 3.8. Las bandas principales de los espectrogramas se asociaron con su grupo químico correspondiente de acuerdo con lo reportado en la literatura.

El PVA (Figura 3.7, amarillo) muestra una banda de absorción fuerte y amplia a  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  asociada a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares y a la vibración de los grupos  $\text{-OH}$ . La banda a  $2940\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la tensión  $\text{C-H}$  de los grupos alquilo, mientras que los picos a  $1680\text{ cm}^{-1}$  y  $1535\text{ cm}^{-1}$  son debidos a la tensión  $\text{C=O}$  y  $\text{C-O}$  de los grupos acetato remanentes en el PVA [24, 90]. Las bandas a  $1480\text{ cm}^{-1}$ ,  $1320\text{ cm}^{-1}$  y  $1090\text{ cm}^{-1}$  están asociadas a los enlaces de los grupos  $\text{CH-CH}_2$ ,  $\text{CH-OH}$  y  $\text{C-O}$ , respectivamente [10, 89, 90, 125].

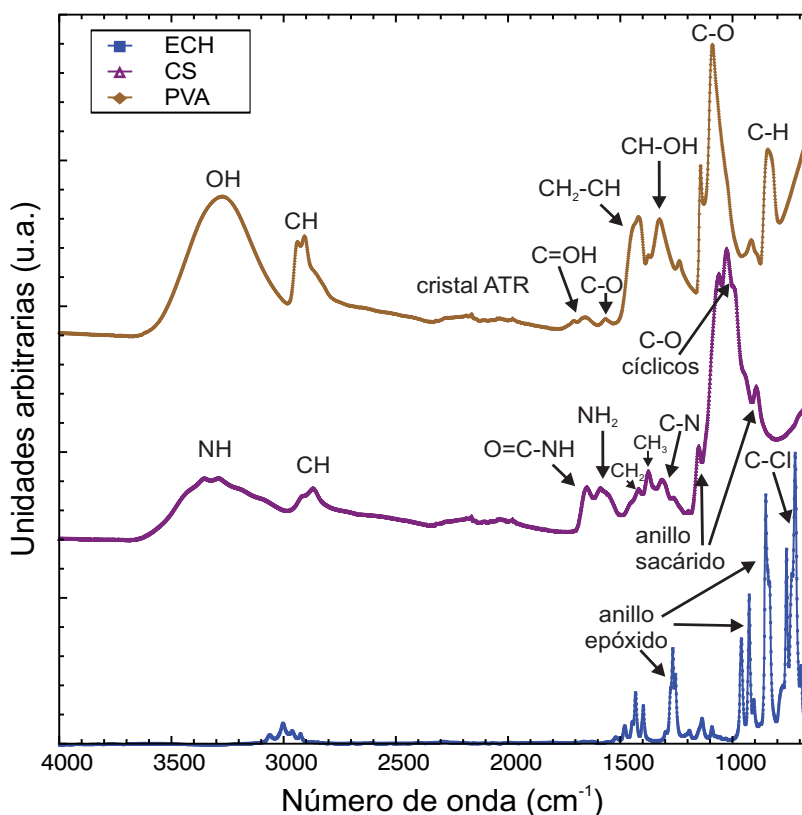


Figura 3.7: Espectros de FTIR de los componentes individuales de las membranas de CS/PVA/ECH: PVA (amarillo), CS (magenta) y ECH (azul).

El espectro del CS (Figura 3.7, magenta) presenta dos bandas amplias de absorción en la región  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración simétrica del enlace N-H de las aminas primarias [89]. La banda a  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la tensión C-H de los alquilos presentes en la estructura; la banda amida I, correspondiente a las amidas de las unidades acetiladas ( $\text{NH-C=O}$ ), se ubica a  $1650\text{ cm}^{-1}$ ; a  $1570\text{ cm}^{-1}$  se presenta la banda correspondiente a la flexión N-H de las aminas primarias; mientras que a  $1300\text{ cm}^{-1}$  aparece la flexión de los enlaces C-N [24, 33, 89]. La banda a  $1090-1030\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la tensión C-O de los grupos alcohol presentes en la estructura sacárida [90]. Finalmente, los picos a  $1151\text{ cm}^{-1}$  y  $899\text{ cm}^{-1}$  corresponden al anillo sacárido [33, 89].

Por su parte, el espectro de la ECH (Figura 3.7, azul) presentó una banda en  $800-700\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-Cl del carbono clorado. Mientras que las bandas entre  $965-850\text{ cm}^{-1}$  y  $1250\text{ cm}^{-1}$  están asociadas al alargamiento simétrico y asimétricos del anillo epóxido, respectivamente [29, 101].

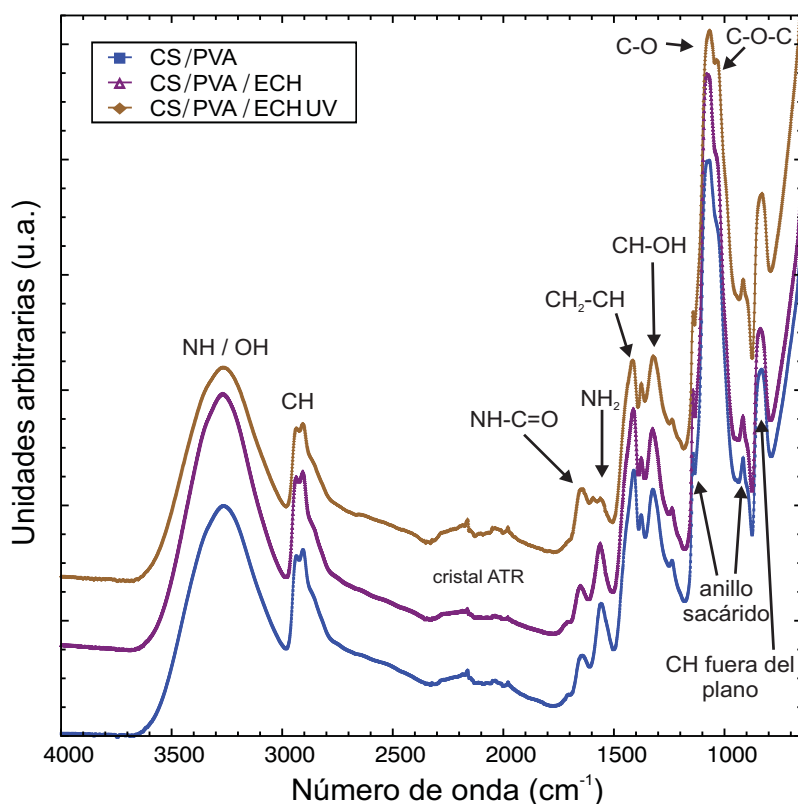


Figura 3.8: Espectros de FTIR de las mezclas poliméricas: CS/PVA (azul), CS/PVA/ECH (magenta) y CS/PVA/ECH UV (amarillo).

La mezcla CS/PVA (Figura 3.8, azul) presenta los picos característicos de ambos componentes. La banda a  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$  asociada a los grupos OH y puentes de hidrógeno, muestra un incremento en la intensidad respecto al PVA puro. De acuerdo con Abdelaal et. al. [20] esto se debe a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como resultado de la interacción entre el CS y el PVA.

Conforme al análisis de FTIR, el espectrograma de las membranas de CS/PVA/ECH (Figura 3.8, magenta) muestra algunos cambios químicos respecto a la mezcla CS/PVA. Estos cambios, pueden ser explicados tomando en consideración los mecanismos de reacción presentados en la sección 3.1:

- a) Incremento en la intensidad de la banda a  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ . Debido a la formación de puentes de hidrógeno y nuevos grupos hidroxilo durante el entrecruzamiento del CS y/o PVA con la ECH.
- b) La banda a  $1090\text{ cm}^{-1}$  asociada a la tensión del enlace C-O de los grupos alcohol incrementa en intensidad indicando la formación de enlaces C-O; dichos enlaces son típicos del entrecruzamiento con de CS y PVA con ECH [33].
- c) Formación de los éteres esperados (C-O-C) debido a la reacción de entrecruzamiento de los compuestos epóxidos con los grupos -OH del CS o del PVA (banda a  $1070\text{ cm}^{-1}$ ) [71, 126, 127].
- d) Decremento de la banda asociada a las aminas primarias del CS ( $1570\text{ cm}^{-1}$ ), sugiriendo el entrecruzamiento de la ECH en los grupos  $-\text{NH}_2$ . De acuerdo con Austero et. al. [33] esta reacción también produce un incremento en la banda correspondiente a los enlaces C-N; sin embargo, en nuestro estudio dicha banda quedó embebida en los picos asociados al PVA y no fue posible identificarla.

Todos estos resultados demuestran que el proceso de entrecruzamiento se llevó a cabo exitosamente y que la estructura química propuesta en la sección 3.1 para la

red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH constituye una buena aproximación de la red formada.

Las membranas de CS/PVA/ECH UV (Figura 3.8, amarillo) presentaron cambios significativos en las bandas asociadas a los grupos: OH, amidas y aminas ( $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1570\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) indicando alta reactividad de dichos grupos debido a su exposición a la radiación UV.

La banda asociada a los grupos OH presentó un decremento significativo en su intensidad, lo cual, de acuerdo con lo reportado por Abdeaal et. al. [20] se debe a la formación de radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) por acción de la radiación UV. Estos radicales libres son altamente reactivos y pueden reaccionar con los grupos  $\text{-NH}_2$  del CS o con otros grupos  $\text{-OH}$  del CS y del PVA, produciendo un entrecruzamiento adicional en la red polimérica. Dicho entrecruzamiento se reflejó en el decremento significativo de la banda a  $1570\text{ cm}^{-1}$  asociada a la aminas primarias del CS y en el incremento de las bandas a  $1090\text{ cm}^{-1}$  y  $1070\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al incremento de enlaces C-O y a la formación de éteres (C-O-C), respectivamente.

Es importante resaltar que en el análisis por FTIR de las membranas entrecruzadas no aparece la banda asociada al C-Cl ( $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ) ni las asociadas al anillo epóxido, por lo que se concluye que no hay trazas remanentes de ECH en los hidrogeles (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV).

### 3.4 Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $^1\text{H}$ RMN)

Para corroborar que en los hidrogeles sintetizados no hubiera trazas de ECH libres (i.e. moléculas de ECH sin reaccionar), se analizó por  $^1\text{H}$  RMN el agua residual empleada en el lavado de las membranas después de su síntesis. Debido a que la ECH es soluble en agua [74], la posible presencia de residuos de ECH debería ser detectada mediante este análisis.

En la Figura 3.9 se presenta una comparación entre el espectro de la ECH empleada como agente entrecruzante y los espectros del agua residual usada en el primer y en el último lavado que se les hizo a las membranas.

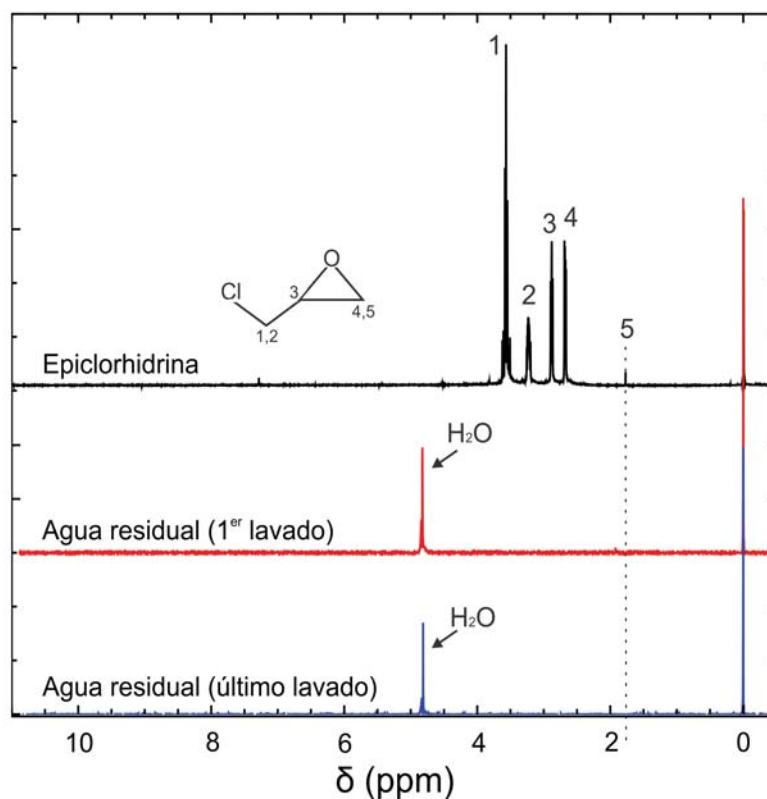


Figura 3.9: Espectros de <sup>1</sup>H RMN de la ECH (negro) y el agua empleada en el primer y último lavado de los hidrogeles (rojo y azul, respectivamente).

La Figura 3.9 muestra un pequeño pico en el espectro correspondiente al primer lavado (Figura 3.9, espectro rojo), dicho pico se encuentra muy cercano al pico número 5 del espectro de ECH (Figura 3.9, espectro negro). Para poder hacer una mejor identificación del pico, en la Figura 3.10 se presenta una ampliación de la zona comprendida entre 1.85 - 2.20 δ(ppm), de este modo, es posible observar la posición exacta de las señales del espectro correspondiente al agua del primer lavado.

En la Figura 3.10, se observan dos picos pero ninguno de ellos corresponde a la ECH. El primero, identificado como “a”, se localiza a 2.13 ppm y corresponde al CH<sub>3</sub> del ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) empleado durante la síntesis de los hidrogeles, lo que explicaría la ligera acidificación del PBS durante las pruebas de hinchamiento. Por otro lado, el segundo pico (identificado como “b”) corresponde a un CH<sub>3</sub> del acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) resultante de la reacción de neutralización entre el ácido acético y el hidróxido de sodio usado durante algunos de los lavados que se le hicieron a los hidrogeles.

Así, estos resultados nuevamente confirman la ausencia de remanentes de ECH en los hidrogeles.

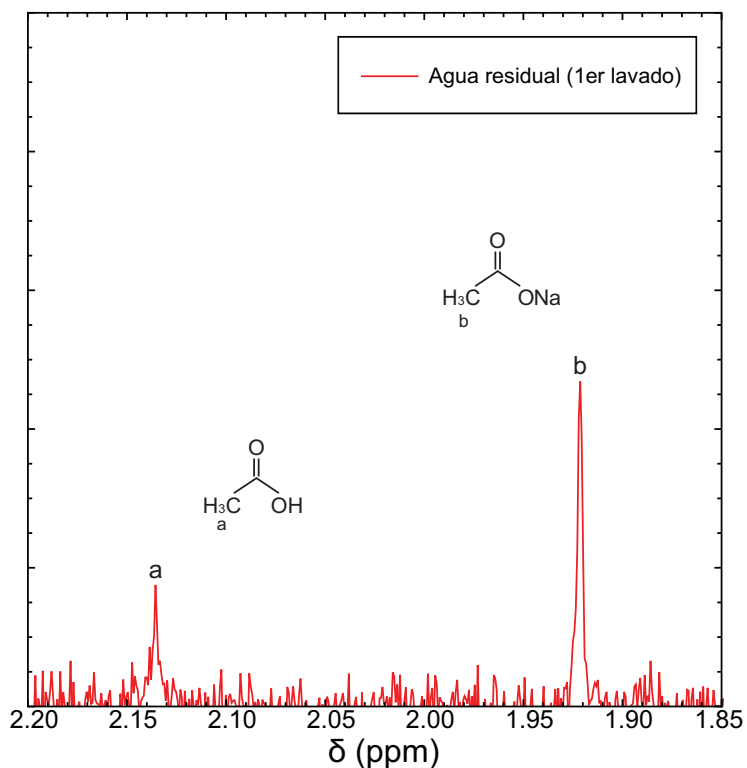


Figura 3.10: Ampliación de la región comprendida entre 2.20-1.85  $\delta$  (ppm) del espectro de  $^1\text{H}$  RMN del agua utilizada en el primer lavado de los hidrogeles. La ausencia de ECH es confirmada.

### 3.5 Difracción de rayos X (DRX)

En los polímeros, las zonas cristalinas son las responsables de la resistencia mecánica, mientras que las amorfas están asociadas a la flexibilidad y elasticidad del material [36]. Debido a ello, se estudió el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV; así como de los componentes individuales de la mezcla (i.e. CS y PVA). En la Figura 3.11 se muestran los difractogramas obtenidos para cada uno de estos materiales.

En el difractograma correspondiente al PVA (Figura 3.11, azul marino) se observan 4 picos relacionados con la fase cristalina; uno de alta intensidad a  $20.06^\circ$ , otro a  $41.02^\circ$  de intensidad media y finalmente dos de baja intensidad a  $12^\circ$  y  $23.38^\circ$ ;

siendo este último, el pico característico del PVA atáctico [128]. De acuerdo con los estudios realizados por Li et al. [128], los picos de difracción corresponden a los planos  $(10\bar{1})$ , (111), (100) y (200), respectivamente. El porcentaje de cristalinidad obtenido a partir del difractograma fue de 24.6%. Estos resultados concuerdan con los reportados en investigaciones previas [20, 24, 128]. La estructura cristalina del PVA corresponde a una celda monoclinica con dimensiones:  $a= 0.781$  nm,  $b= 0.252$  nm (dirección del eje de la cadena),  $c= 0.551$  nm y un ángulo  $\beta= 92.2^\circ \pm 0.3^\circ$ ; cada celda unitaria está compuesta por dos monómeros de PVA (i.e. dos unidades vinil alcohol) [102, 103].

El CS por su parte, presenta una celda unitaria ortorrómbica de dimensiones  $a= 2.86$  nm,  $b= 0.95$  nm y  $c = 1.046$  nm (dirección del eje de la cadena). Cada celda unidad se compone de cuatro unidades de D-glucosaminas conformadas en dos cadenas helicoidales antiparalelas, las cuales, se encuentran estabilizadas debido a la formación de puentes de hidrogeno entre ellas [24, 64]. El difractograma de las membranas de CS (Figura 3.11, magenta) presenta cuatro picos de cristalinidad:  $9.98^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $21.69^\circ$  y  $40.5^\circ$ . Estos picos están asociados a los planos de difracción (020), (200), (201) y (143) respectivamente [129]. A diferencia del PVA, los picos de difracción del CS son amplios y de menor intensidad, lo cual deja ver que su fase predominante es la amorfa. El porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles de CS fue de 16.3%. Resultados similares han sido reportados en la literatura [17, 24].

Los hidrogeles de CS/PVA presentaron un mayor porcentaje de cristalinidad respecto al CS puro (22.8% vs. 16.3%), por lo que se espera que su resistencia mecánica de igual manera sea superior. En su difractograma (Figura 3.11, amarillo) es posible apreciar que el pico a  $9.98^\circ$  correspondiente al CS y el pico a  $41.02^\circ$  del PVA desaparecen; mientras que los picos de difracción a  $20^\circ$  y  $20.06^\circ$  del CS y PVA respectivamente, se superponen en un solo pico de intensidad media a  $20.2^\circ$ . Este comportamiento concuerda con lo reportado recientemente por Islam et. al. [130]. Así, cada pico de difracción puede ser indexado con plano del componente individual correspondiente (CS o PVA), tal como se resume en la Tabla I.

El análisis de DRX de igual manera es útil para estudiar la interacción entre los componentes de la mezcla polimérica [17, 101]. Si los componentes no tienen



interacción, cada uno conservará su región cristalina y en el difractograma de la mezcla deberán aparecer los picos cristalinos de cada componente. Dado que esto no se cumple para los hidrogeles de CS/PVA, es posible determinar que existe cierto grado de compatibilidad entre ellos. Dicha interacción puede ser atribuida a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino del CS y los grupos hidroxilo del PVA, los cuales, limitarían hasta cierto punto la movilidad de las cadenas, evitando su plegamiento para formar sus respectivas regiones cristalinas.

Cuando se adiciona el agente entrecruzante (ECH) a la mezcla CS/PVA, el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles decrece notablemente, disminuyendo hasta el 8.7%. Su difractograma (Figura 3.11, verde) conserva tres picos de difracción, dos atribuidos al CS ( $\sim 19.64^\circ$ ,  $\sim 21.28^\circ$ ) y uno al PVA ( $\sim 40.85^\circ$ ). El pico a  $\sim 12^\circ$  que aparecía en el difractograma de las membranas de CS/PVA y que se relacionaba con el PVA, desapareció al agregar ECH a la mezcla. Lo anterior se debe a que en estas membranas, la interacción entre las moléculas de CS y PVA se torna más fuerte por los enlaces covalentes que la ECH forma entre las cadenas poliméricas de ambos componentes, lo que implica que el plegamiento de las cadenas sea más difícil tras la reacción de entrecruzamiento. De este modo, el entrecruzamiento inhibe el empaquetamiento de las cadenas al reducir su grado de libertad en una configuración tridimensional, limitando o incluso previniendo la formación de regiones cristalinas [24].

El difractograma de las membranas de CS/PVA/ECH UV (Figura 3.11, azul cielo) de igual manera presenta tres picos de difracción, uno de intensidad media a  $19.64^\circ$  y dos de baja intensidad a  $21.22^\circ$  y  $40.77^\circ$ ; al igual que en las membranas sin irradiar (CS/PVA/ECH) dos de estos picos se asocian al CS ( $19.64^\circ$  y  $21.22^\circ$ ) y uno al PVA ( $40.77^\circ$ ). Los picos de difracción son ligeramente más anchos y de menor intensidad, lo cual indica que la cristalinidad disminuye y la muestra se vuelve más amorfa. El índice de cristalinidad calculado a partir de su difractograma fue de 8.1%, siendo menor al de las películas sin irradiar. Este ligero decremento puede ser atribuido al fotoentrecruzamiento de la red polimérica producido por la radiación UV, creando una red más rígida que difícilmente podría acomodarse para formar regiones cristalinas.

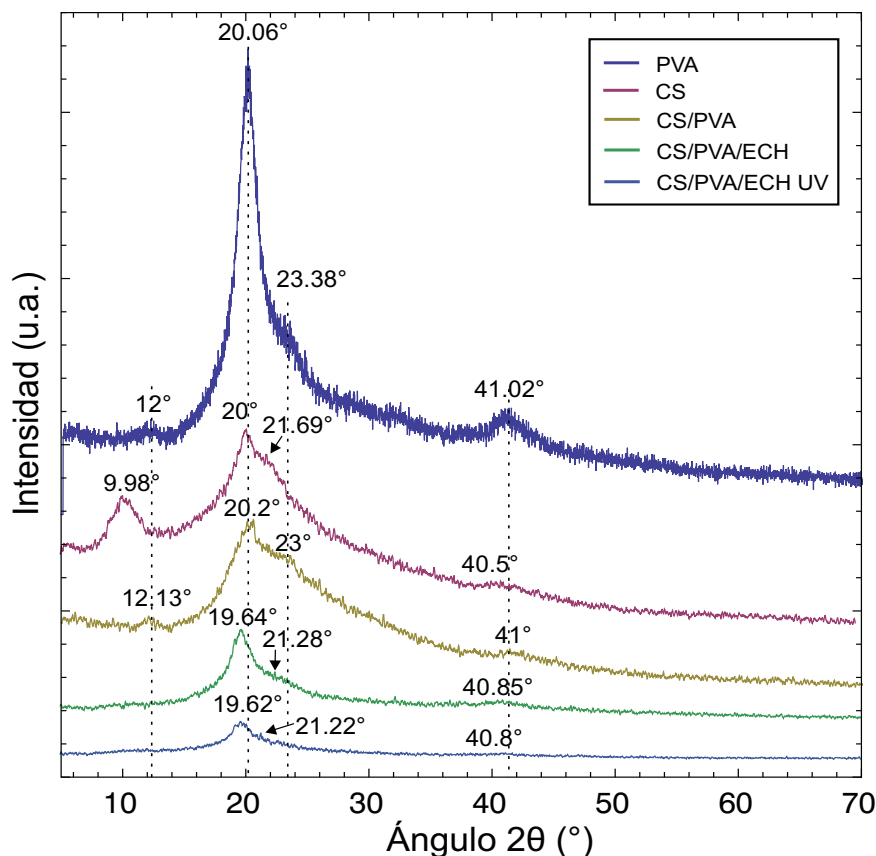


Figura 3.11: Diffractogramas de las membranas CS (magenta), PVA (azul marino), CS/PVA (amarillo), CS/PVA/ECH (verde) y CS/PVA/ECH UV (azul cielo).

El hecho de que el porcentaje de cristalinidad haya disminuido tanto al agregar los agentes entrecruzantes (ECH y radiación UV), es un indicativo más de que el proceso de entrecruzamiento fue exitoso. Muy probablemente las zonas cristalinas presentes en ambas membranas (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV), se deben a cadenas de CS o PVA que no fueron entrecruzadas y al no tener grupos sustituyentes en su cadena principal cuentan con la flexibilidad suficiente para plegarse y acomodarse de forma periódica. Con la finalidad de determinar con precisión esto, así como los planos de difracción a los que se asocian los picos cristalinos de las membranas de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV es necesario llevar a cabo un estudio de difracción más profundo. Cabe destacar que hasta el momento los planos de difracción y la estructura cristalina de estas membranas no ha sido reportada en la literatura.

En otras investigaciones también se ha reportado que la adición de agentes entrecruzantes (físicos o químicos) a la mezcla CS/PVA reduce la cristalinidad de los hidrogeles [25, 67, 130]. Por lo tanto, los resultados de rayos X presentados son congruentes con los reportados en la literatura.

En la Tabla I se concentran los valores del ángulo de difracción  $2\theta$ , los planos de difracción asociados y el porcentaje de cristalinidad obtenido para cada una de las membranas analizadas por difracción de rayos X.

Tabla I. Resumen de los resultados obtenidos del análisis de DRX para las membranas de PVA, CS, CS/PVA, CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV

Hidrogel	Ángulo de difracción $2\theta$ (°)	Plano de difracción	% cristalinidad
PVA	12.00	(100)	24.6
	20.06	(10 $\bar{1}$ )	
	23.38	(200)	
	41.02	(111)	
CS	9.98	(020)	16.3
	20.00	(200)	
	21.69	(201)	
	40.50	(143)	
CS/PVA	12.13	(100)	22.8
	20.20	(10 $\bar{1}$ ) (200)	
	23.00	(200)	
	40.00	(143)	
CS/PVA/ECH	19.64	-----	8.7
	21.28	-----	
	40.85	-----	
CS/PVA/ECH UV	19.62	-----	8.1
	21.22	-----	
	40.80	-----	

----- Los planos de difracción de los picos cristalinos podrían ser indexados tomando como referencia los planos y picos del CS o PVA, sin embargo, al tratarse de membranas entrecruzadas su estructura polimérica difiere del de una simple mezcla, por lo que hace falta un análisis más minucioso para determinar su estructura cristalina y planos de difracción. Cabe destacar que hasta el momento estos no han sido reportados en la literatura.

### 3.6 Caracterización mecánica

Todas las membranas ensayadas se hidrataron previamente con PBS (pH= 7.4) y se mantuvieron a 37 °C, con la finalidad de caracterizarlas bajo condiciones similares a las que estarán sometidas durante el cultivo *in vitro* e *in vivo*.

Como se discutió anteriormente, el hinchamiento está íntimamente relacionado con las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles; por lo tanto, su comportamiento elástico es altamente dependiente de la cantidad de líquido que pueden absorber [23, 35, 87]. En estado hidratado, la mayoría de los hidrogeles se comportan como elastómeros; lo cual significa que su comportamiento mecánico es no lineal y depende altamente de la arquitectura de su red polimérica [23, 31, 131].

En la Figura 3.12, se muestra la respuesta mecánica bajo tensión uniaxial de las tres muestras más representativas de cada grupo de hidrogeles ensayado (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV). Los resultados fueron graficados como curvas de esfuerzo en función de la razón de elongación,  $\sigma$  vs.  $\lambda - \frac{1}{\lambda^2}$ , de acuerdo a lo desarrollado en la sección 2.4.

Las curvas obtenidas revelan que el comportamiento mecánico de los hidrogeles no es exactamente el mismo, incluso para muestras pertenecientes al mismo grupo. Lo cual, puede ser debido a: variaciones durante la síntesis de los lotes que conforman un mismo grupo de hidrogeles (i.e. añadir más/menos disolución de CS o PVA a un lote, cambios en la temperatura durante la preparación de las disoluciones, tiempo de reacción, pH de las disoluciones, etc.); alteraciones en el mecanismo de la reacción de entrecruzamiento con ECH (escisión de las cadenas y/o sustituciones nucleofílicas dobles); cambios en el pH del PBS empleado para el hinchamiento de las muestras, o incluso debido a una posible anisotropía mecánica de los materiales.

No obstante, esta última opción queda descartada. Esto debido a que recientemente se ha logrado un control más estricto sobre la síntesis de los hidrogeles y los nuevos materiales no presentan esta disparidad en su comportamiento mecánico. Por lo tanto, la inconsistencia de los hidrogeles ensayados en este trabajo de tesis (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV), únicamente se atribuye a variaciones durante la síntesis de las membranas.

Debido a que algunas muestras se fracturan a partir de  $\lambda - \lambda^{-2} = 0.06$  y con la finalidad de incluir a todas las muestras dentro del estudio, el análisis mecánico de ambos grupos de hidrogeles se llevó a cabo en la región comprendida entre 0.01 - 0.05 en el eje de la razón de elongación ( $\lambda - \lambda^{-2}$ ) (Figura 3.12). De este modo, la pendiente de la curva en dicha región es considerada como un módulo de corte equivalente ( $G_{0.01-0.05}$ ).

A partir de  $G_{0.01-0.05}$ , el módulo elástico ( $E$ ) de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV puede ser conocido mediante la expresión (31),  $E = 3G$ , determinada en la sección 2.4. Así, el módulo de elasticidad promedio para los hidrogeles de CS/PVA/ECH fue de  $9 \pm 1$  MPa, mientras que los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV mostraron un módulo elástico ligeramente mayor, siendo éste de  $11.5 \pm 2$  MPa.

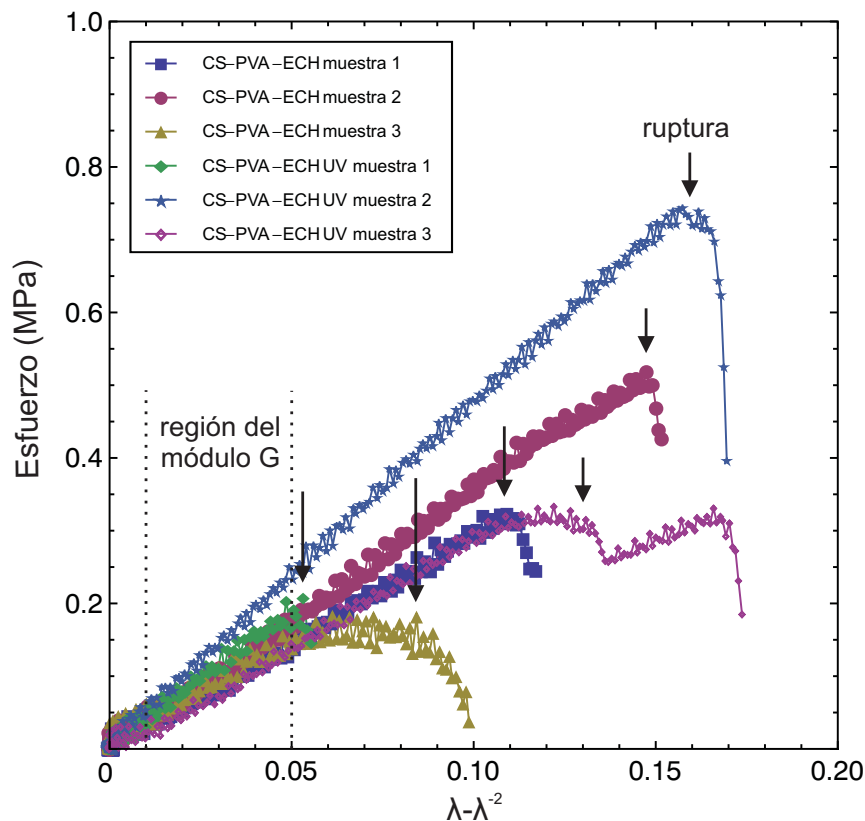


Figura 3.12: Curvas de esfuerzo como función de la razón de elongación de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV. Ambos grupos de muestras presentan un comportamiento no lineal.

La diferencia del módulo elástico entre ambos grupos de hidrogeles es atribuida al fotoentrecruzamiento que sufren las membranas de CS/PVA/ECH UV durante su esterilización, formando de este modo una red polimérica que opone mayor resistencia a ser deformada. Este incremento en el entrecruzamiento es determinado cuantitativamente más adelante, cuando se estudien los parámetros estructurales de la red. En la Figura 3.13, se compara el módulo elástico de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV con el de hidrogeles hechos a base de CS, PVA y CS/PVA, reportados en la literatura [25, 31, 132, 133].

La principal desventaja de los polímeros naturales es que generalmente presentan variaciones significativas en sus propiedades mecánicas, siendo éstas la mayoría de las veces, menores a las propiedades presentadas por los polímeros sintéticos [62, 63]. Al observar la Figura 3.13 es posible percatarse que lo anterior se cumple para los hidrogeles de CS y PVA, cuyo valor de  $E$  reportado en la literatura es de  $6.15 \pm 4.9$  MPa y  $49.5 \pm 3.2$  MPa, respectivamente [132, 133].

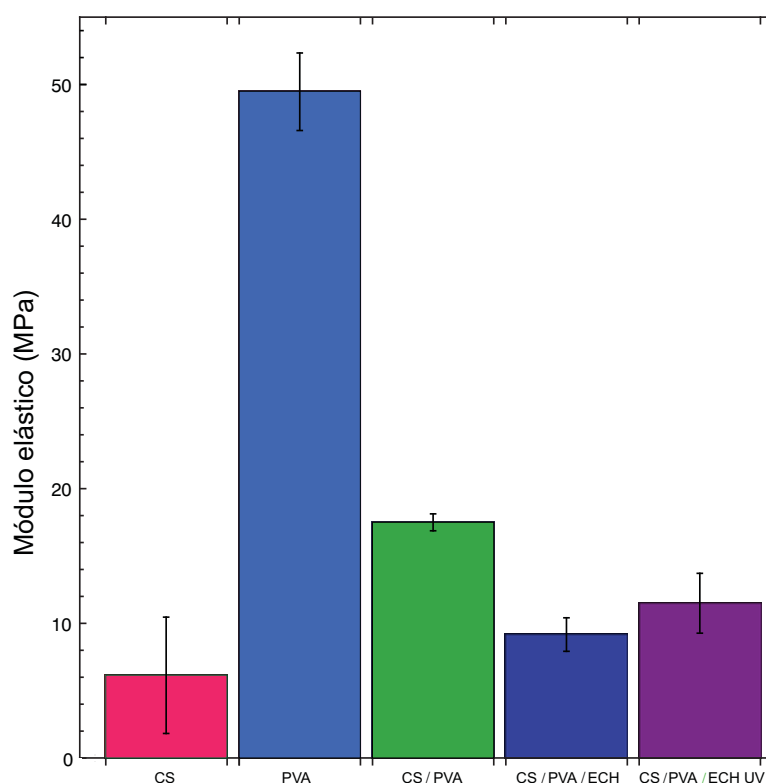


Figura 3.13: Gráfica comparativa de los módulos elásticos de hidrogeles de CS<sup>[133]</sup>, PVA<sup>[132]</sup>, CS/PVA<sup>[24, 25, 31]</sup>, CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV.

De acuerdo con los resultados de Bahrami et. al. [31] y Costa-Junior et al [24, 25], los hidrogeles de CS/PVA presentan un módulo elástico de ~17 MPa, el cual, es mayor al reportado para hidrogeles de CS puro. De esta forma, el mezclarlo con un polímero sintético (PVA) contribuye a incrementar su  $E$ .

En la Figura 3.13 se observa que el módulo de elasticidad promedio para los hidrogeles entrecruzados (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV) es inferior al de la mezcla CS/PVA; no obstante, presentan un módulo mayor al del polisacárido por sí solo. Anteriormente, se ha dejado claro que el entrecruzamiento de la red polimérica es usado para obtener un polímero más estable en presencia de un disolvente; esto es, cuando las membranas requieren estar hidratadas debido a su aplicación (membranas de filtración, andamios celulares, limpieza de aguas residuales, entre otros). Así, a pesar de que el hidrogel de CS/PVA exhibe mejores propiedades mecánicas, su principal desventaja es que esta membrana tenderá a disolverse más fácilmente.

De acuerdo con Li et. al. [132], el entrecruzamiento del CS a partir de cierta cantidad de agente entrecruzante, puede interferir en la formación de puentes de hidrógeno y reducir su cristalinidad. Como resultado de esto, Mi et. al. [67] y Bispo et. al. [32] observaron una disminución en la resistencia última a la tensión<sup>18</sup> (UTS, por sus siglas en inglés) de las membranas de CS entrecruzadas químicamente con relativamente altas concentraciones ( $> 0.5$  mM) de glutaraldehído o genipin.

En los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV, también se observó una disminución en la UTS y en  $E$ , respecto a los hidrogeles de CS/PVA. Esto se atribuye a la pérdida de cristalinidad a causa del entrecruzamiento con ECH y luz UV, tal como quedó evidenciado en los resultados de difracción de rayos X.

Debido a que la respuesta mecánica de los hidrogeles está fuertemente relacionada con su hinchamiento, un incremento en el grado de entrecruzamiento implica un decremento en su índice de hinchamiento. De este modo, la red polimérica no es capaz de absorber el mismo volumen de líquido si la movilidad de

---

<sup>18</sup> Máximo esfuerzo de tensión que el material es capaz de soportar y tras el cual ocurre la fractura.

sus cadenas se ha visto reducida y como resultado de ello, los hidrogeles se vuelven menos flexibles e incrementan sus propiedades mecánicas ( $E$  y UTS). Tal como sucedió con las membranas de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV, en donde, las primera presentaron el mayor porcentaje de hinchamiento al equilibrio ( $Q_e$ ) pero menores propiedades mecánicas respecto a las membranas sometidas a radiación UV (Tabla II).

La tendencia de estos resultados concuerda con el comportamiento presentado por otros hidrogeles [24, 35, 81, 134-136].

Tabla II. Relación entre las propiedades mecánicas y el índice de hinchamiento al equilibrio de las membranas de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV.

Hidrogel	$Q_e^a$ (%)	$E^b$ (MPa)	UTS <sup>c</sup> (MPa)
CS/PVA/ECH	156	9 ± 1	0.3 ± 0.1
CS/PVA/ECH UV	148	11.5 ± 2	0.4 ± 0.15

<sup>a</sup>  $Q_e$  representa el índice de hinchamiento al equilibrio, <sup>b</sup>  $E$  el módulo elástico de los hidrogeles y <sup>c</sup> UTS es la resistencia última a la tensión.

De acuerdo con los estudios realizados por Park et al [80, 81], el cartílago auricular humano presenta un módulo elástico ( $E$ ) de 5.11 - 12.2 MPa y una resistencia a la tensión última (UTS) de 2.18 - 8.8 MPa. Conforme a los resultados obtenidos de las pruebas de tensión uniaxial, mostrados en la Tabla II, tanto los hidrogeles de CS/PVA/ECH como los de CS/PVA/ECH UV cumplen con el valor de  $E$ ; sin embargo, quedan por debajo de la UTS requerida. No obstante, los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV pueden ser una alternativa viable como substitutos de este tejido. Esto, debido a que brindan un soporte mecánico inicial similar al del cartílago elástico nativo y su valor de UTS puede incrementarse una vez que se formen los constructos y los condrocitos adheridos a la superficie del material comiencen a sintetizar fibras colágena y elastina en su MEC.

Como trabajo a futuro, se propone realizar la caracterización mecánica de los constructos, una vez concluido su periodo de cultivo *in vitro*. Ello con la finalidad de



determinar los posibles cambios en las propiedades mecánicas iniciales de los andamios (membranas de CS/PVA/ECH UV) y la contribución de la MEC a la resistencia mecánica del nuevo cartílago.

Es importante resaltar que la mayoría de las investigaciones en donde se estudian materiales que pretenden ser empleados como andamios celulares para la sustitución de algún tejido (piel, hueso, cartílago, ligamento, etc.), difícilmente se lleva a cabo una comparación cuantitativa con las propiedades mecánicas del tejido nativo a sustituir. En algunas ocasiones, el análisis y la comparación de sus propiedades mecánicas se hace basándose únicamente en las propiedades de los mismos materiales cuando se alteran parámetros como: el peso molecular, la composición, el disolvente, el agente entrecruzante, entre otros; dejando totalmente de lado si se cumple o no con los requerimientos de la aplicación deseada.

### **3.7 Propiedades estructurales**

Como se ha evidenciado anteriormente, el proceso de esterilización por radiación UV produce una contribución al entrecruzamiento de la red polimérica. De tal forma que si ésta se suma al entrecruzamiento químico debido a la ECH, los polímeros radiados deberán presentar una densidad de entrecruzamiento mayor a las muestras de referencia (CS/PVA/ECH). Además, dicho incremento en la densidad de entrecruzamiento conlleva cambios en los parámetros estructurales de los hidrogeles.

De acuerdo con la teoría elástica de los elastómeros, presentada en las secciones 2.4 y 2.5.2, es posible determinar los parámetros que describen la estructura de la red si se conoce el módulo de corte de los hidrogeles ( $G$ ) y la concentración ( $c$ ) de los polímeros en la disolución entrecruzada.

Debido a la falta de reproducibilidad en el comportamiento mecánico de los hidrogeles (evidenciado en la sección anterior), los resultados presentados en esta sección muestran el comportamiento de 3 muestras significativas por cada grupo de hidrogeles ensayado (CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV). El promedio y la desviación

estándar de cada grupo (cuadro rosa y círculo azul con barras de error) también fue determinado y graficado dentro de la misma figura.

El efecto de la radiación UV sobre la estructura de la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH se presenta en la Tabla III.

Tabla III. Propiedades estructurales de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV.

Hidrogel	$\varphi_c^a$ (mol·m <sup>-3</sup> )	$M_{crl}^b$ (g·mol <sup>-1</sup> )	$D_N^c$ (nm)	$\nu_s^d$
CS/PVA/ECH	1241.23 ± 187	39.08 ± 5.8	1.37 ± 0.07	0.64 ± 0.01
CS/PVA/ECH UV	1556.21 ± 343	31.71 ± 6.8	1.27 ± 0.09	0.68 ± 0.01

<sup>a</sup> $\varphi_c$  se refiere a la densidad de entrecruzamiento, <sup>b</sup> $M_{crl}$  representa el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento, <sup>c</sup> $D_N$  es el tamaño de malla de la red polimérica y <sup>d</sup> $\nu_s$  es la fracción volumétrica del polímero en el hidrogel hinchado hasta su equilibrio.

Los hidrogeles radiados con UV mostraron una densidad de entrecruzamiento ( $\varphi_c$ ) de 1556.21 ± 343 mol m<sup>-3</sup>, lo que significó un incremento de alrededor del 25% respecto a los hidrogeles de CS/PVA/ECH no radiados (1241.23 ± 187 mol m<sup>-3</sup>). Por otro lado, el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{crl}$ ) y el tamaño de malla ( $D_N$ ) disminuyeron con el incremento en la densidad de entrecruzamiento; mientras que la fracción volumétrica del polímero en el hidrogel hinchado hasta su equilibrio ( $\nu_s$ ) se incrementó (Tabla III).

De acuerdo con lo reportado por Mathews et. al. [23] y D'Errico et. al. [110], el incremento en la densidad de entrecruzamiento se debe a que los monómeros que anteriormente formaban parte de una cadena polimérica se unen covalentemente a otros monómeros, generando nuevos puntos de unión entre ellas (puntos de entrecruzamiento) y conformando nuevas cadenas. Además, debido a que las nuevas cadenas que ahora integran la red están conformadas por menos monómeros, estas son más cortas y de menor peso molecular, por lo cual su  $D_N$  y  $M_{crl}$  también es menor.

La relación entre el  $M_{crl}$  y el  $D_N$  de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV se presenta en la Figura 3.14.

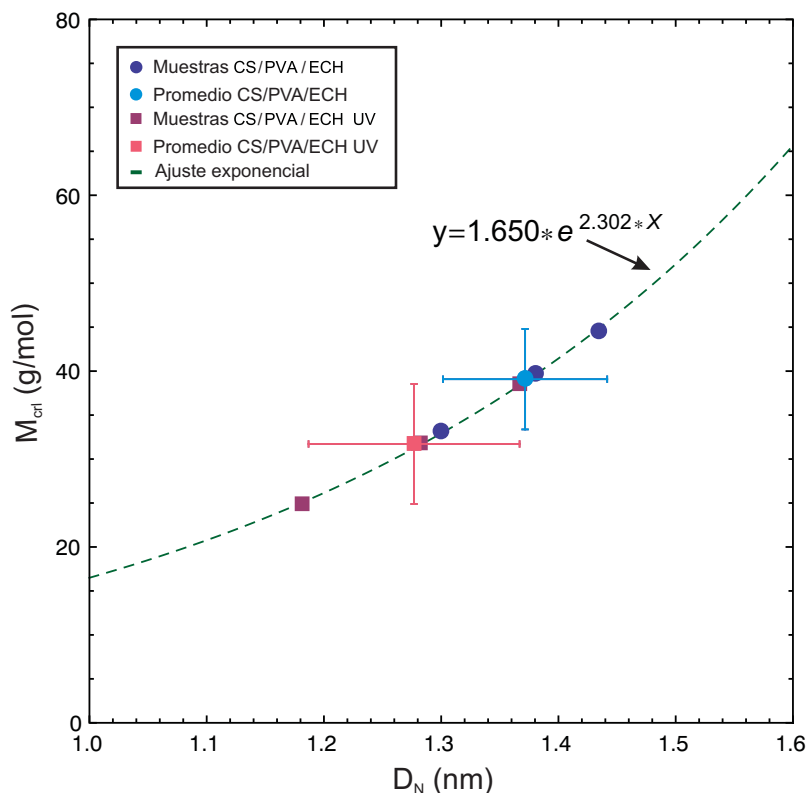


Figura 3.14:  $M_{crit}$  como función de  $D_N$  para los hidrogel de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV. Los cuadros magenta representan a las muestras de CS/PVA/ECH UV y los círculos azul rey a las de CS/PVA/ECH. El cuadro rosa y el círculo azul cielo con las barras de error corresponden al promedio de las muestras de CS/PVA/ECH UV y CS/PVA/ECH, respectivamente. Todas las muestras siguen una tendencia exponencial y su promedio cae dentro del ajuste realizado.

De acuerdo con esta gráfica, las muestras de ambos hidrogel siguen una tendencia exponencial, de tal manera que a medida que el  $D_N$  se incrementa el  $M_{crit}$  crece exponencialmente. Como ya se había discutido anteriormente, los hidrogel sometidos al entrecruzamiento adicional con luz UV son los que presentan el menor tamaño de malla y peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $D_N$  y  $M_{crit}$ , respectivamente). Es importante notar que el promedio de las muestras estudiadas (Figura 3.14, cuadro rosa y círculo azul cielo con barras de error) cae dentro del ajuste realizado, por lo que a pesar de la falta de reproducibilidad en el comportamiento mecánico de las muestras, los parámetros estructurales de cada grupo de hidrogel pueden ser bien descritos por el promedio de sus componentes.

Conforme a los resultados presentados en la Tabla III, el incremento en la densidad de entrecruzamiento produce un aumento en  $\nu_s$ , lo cual se asocia a una menor capacidad de absorción. Lo anterior se debe principalmente a dos factores:

1) una red con mayor densidad de entrecruzamiento tiene menos espacio disponible para ser ocupado por el agua debido al decremento de  $D_N$  y 2) al limitar la movilidad de las cadenas se aumenta la fuerza elástica que se opone al hinchamiento.

Esta pérdida en la capacidad de absorción de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV ya había sido evidenciada durante las pruebas de hinchamiento (sección 3.2) y era atribuida a un entrecruzamiento adicional de la red debido al proceso de esterilización, lo cual, queda finalmente comprobado en esta sección.

De este modo, el índice de hinchamiento está fuertemente relacionado con la estructura del hidrogel. De acuerdo con Liu et. al. [113] un alto índice de hinchamiento al equilibrio ( $Q_e$ ) se asocia a un tamaño de malla grande ( $D_N$ ) y por ende a un alto  $M_{cr1}$ . Así, los hidrogeles de CS/PVA/ECH que presentaron un índice de hinchamiento de 156% tienen un  $D_N$  y un  $M_{cr1}$  mayor al de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV que solo alcanzaron el 148% de hinchamiento al equilibrio.

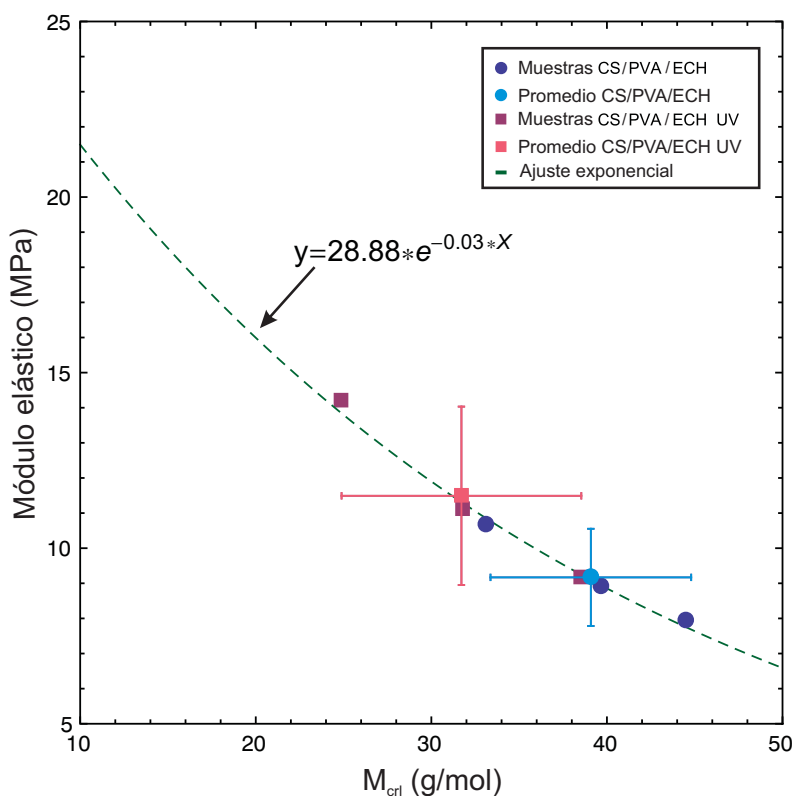


Figura 3.15: Módulo elástico como función del peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{cr1}$ ) de las muestras de CS/PVA/ECH (puntos azul rey) y CS/PVA/ECH UV (cuadros magenta). Para ambos hidrogeles, conforme el  $M_{cr1}$  incrementa, el módulo elástico disminuye exponencialmente. El cuadro rosa y el círculo azul con las barras de error corresponden al promedio de las muestras de CS/PVA/ECH UV y CS/PVA/ECH, respectivamente. El promedio de las muestras ensayadas cae dentro del ajuste de los datos experimentales.

Por otro lado, el comportamiento mecánico de los hidrogeles también puede ser descrito en términos de la estructura de la red polimérica aplicando teorías que involucren parámetros estructurales como el número de cadenas elásticamente activas y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento [58]. Por lo tanto, entender la estructura de su red, es extremadamente importante para obtener información acerca de sus propiedades mecánicas.

La Figura 3.15 muestra la relación entre el módulo elástico y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento. De esta manera, para los hidrogeles estudiados en este trabajo de tesis, al incrementarse el  $M_{crl}$ , el valor del módulo elástico ( $E$ ) decrece exponencialmente. Como el tamaño de malla depende directamente del peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (Figura 3.14), el módulo elástico también se verá influenciado por este parámetro. Así, conforme el  $D_N$  crece, el módulo elástico disminuye exponencialmente (Figura 3.16).

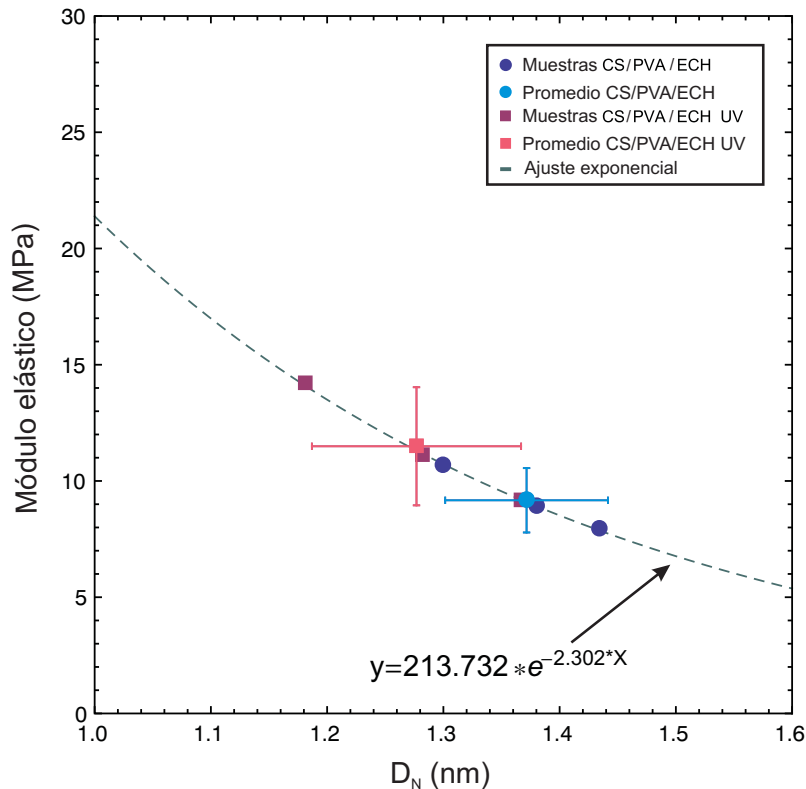


Figura 3.16: Módulo elástico como función del tamaño de malla ( $D_N$ ) de los hidrogeles de CS/PVA/ECH (puntos azul rey) y CS/PVA/ECH UV (cuadros magenta). Conforme el  $D_N$  incrementa, el módulo elástico disminuye exponencialmente. El cuadro rosa y el círculo azul cielo con las barras de error corresponden al promedio de las muestras de CS/PVA/ECH UV y CS/PVA/ECH, respectivamente.

Por lo tanto, a menor  $\varphi_c$ : mayor  $M_{crl}$ , mayor  $D_N$  y menor  $E$ ; mientras que, a mayor  $\varphi_c$ : menor  $M_{crl}$ , menor  $D_N$  y mayor  $E$ .

Conforme a estos resultados es posible inferir que el módulo elástico de los hidrogeles de CS/PVA/ECH y CS/PVA/ECH UV se rige por la estructura de la red polimérica, o de manera similar, por el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_{crl}$ ), la densidad de entrecruzamiento ( $\varphi_c$ ) y el tamaño de malla ( $D_N$ ).

### 3.8 Adhesión y viabilidad celular sobre los andamios

Debido a que las propiedades del material incluyendo su composición, índice de hinchamiento, carga superficial, porosidad, rugosidad y módulo elástico, pueden influenciar la respuesta celular, entender la interacción *in vitro* célula-hidrogel es un primer paso para predecir la viabilidad de las membranas que pretenden ser usadas en la regeneración de tejidos [18].

La proliferación y diferenciación de las células sobre el andamio estarán influenciadas por la adhesión y diseminación celular durante la primer fase de cultivo de los constructos [17, 26]. De esta forma, la adhesión celular constituye uno de los prerequisites para evaluar la biocompatibilidad de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV.

La adhesión y morfología de las células en contacto con los andamios celulares (constructos) se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Tras 10 días de cultivo *in vitro*, las membranas de CS/PVA/ECH UV sin células (muestras de control) presentaron una superficie lisa y sin indicios de erosión (Figura 3.17 A); mientras que los constructos (membranas de CS/PVA/ECH UV con células) mostraron adhesión y diseminación de los condrocitos sembrados sobre su superficie (Figura 3.17 B-D).

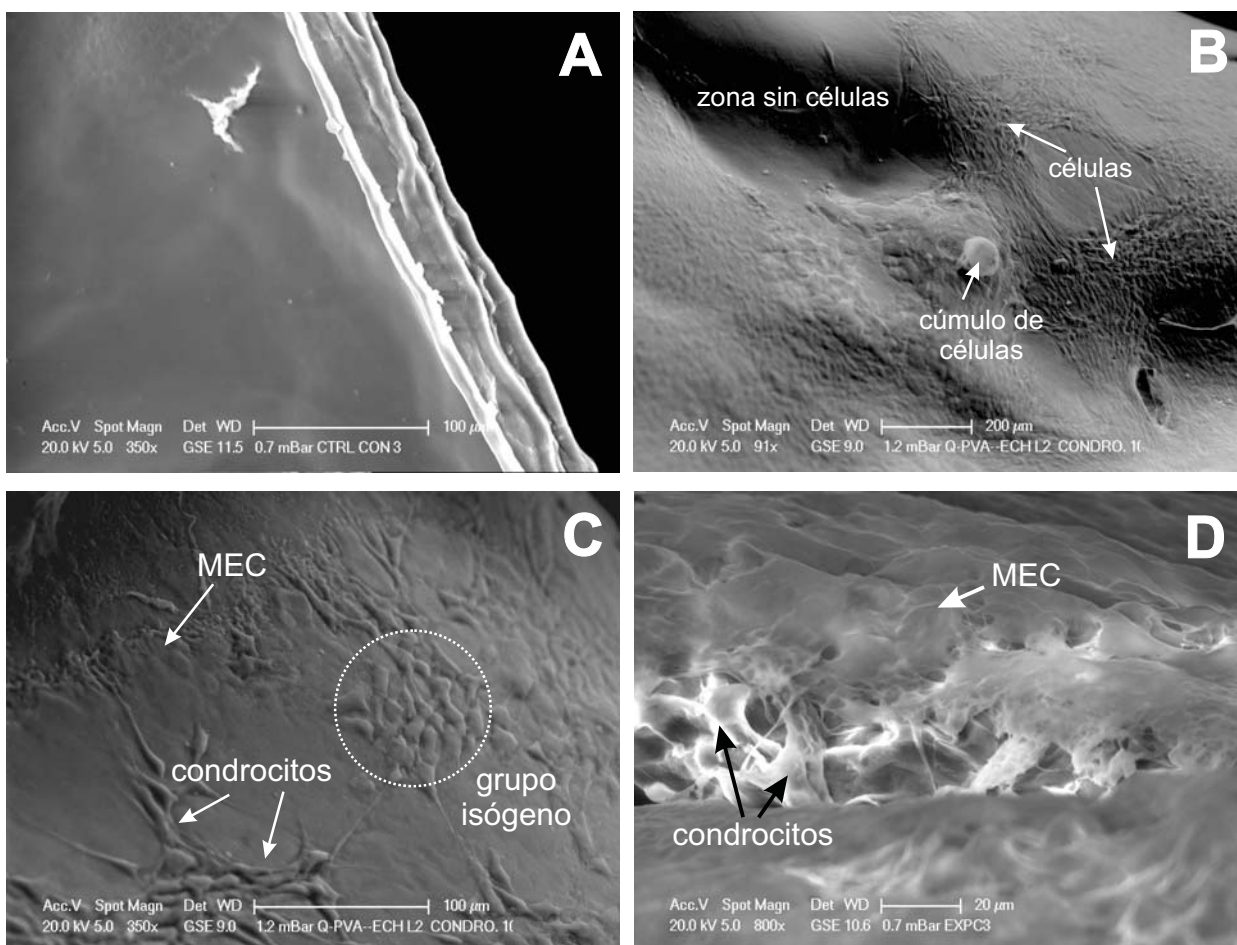


Figura 3.17: Superficie de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV tras 10 días de cultivo *in vitro*. A) Superficie del hidrogel de CS/PVA/ECH UV sin células (muestra de control). B) Distribución de las células sobre la superficie del hidrogel. C) Condrocitos adheridos al andamio celular y organizados en grupos isógenos. D) Condrocitos adheridos al hidrogel y embebidos en la matriz extracelular (MEC) sintetizada por ellos mismos.

En la Figura 3.17 B es posible apreciar que después de los 10 días de cultivo bajo condiciones *in vitro*, las células aún no cubren la totalidad de la superficie de la membrana, por lo cual, no se cuenta con un constructo confluyente y los condrocitos tienen la posibilidad de seguir replicándose y migrando hacia las zonas despobladas. Además se observaron algunos cúmulos de células, los cuales, muy probablemente se generaron desde el proceso de tripsinización de los cultivos primarios, en donde se formó un pellet celular que no pudo ser disgregado.

De acuerdo con McKenzie et. al. [137] la morfología de las células puede proporcionar evidencia de su grado de compatibilidad con el material. De esta forma, un indicador de que una célula interactúa bien con el material empleado como andamio, es la rapidez con la que se extiende sobre la superficie y pierde la forma

esférica que asumió mientras se encontraba en medio acuoso (suspensión celular). En la Figura 3.17 C se observa que los condrocitos adheridos a la superficie del hidrogel adquirieron una morfología fusiforme, dejando de lado la forma poligonal que presentaban cuando fueron sembrados. Asimismo se encontró que las células comenzaron a sintetizar matriz extracelular (MEC) y a organizarse en pequeños grupos denominados grupos isógenos o nidos celulares (Figura 3.17 C), característicos del cartílago en crecimiento [138].

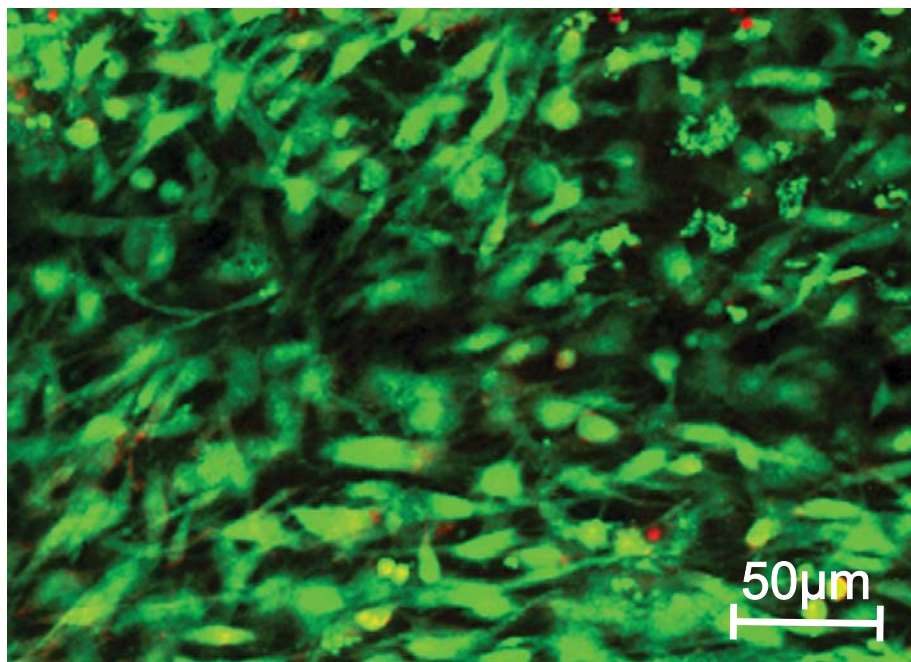
La síntesis de MEC por parte de los condrocitos es un indicativo más de su adhesión a los hidrogeles, ya que es sabido que las células dependen de su adhesión a un sustrato para su crecimiento, proliferación y síntesis de MEC [124]. La Figura 3.17 D muestra la MEC sintetizada sobre la superficie del hidrogel y la presencia de condrocitos embebidos en ella.

Una vez comprobada la adhesión celular sobre los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV, la viabilidad de los condrocitos a los 10 días de cultivo *in vitro* se evaluó mediante pruebas con calceína-AM y homodímero de etídio. La viabilidad celular indica de manera directa la proporción de células vivas que hay, en relación con el número total de células que encontramos sobre la superficie de los hidrogeles empleados como andamios celulares.

La determinación de la viabilidad celular depende de las propiedades físicas y bioquímicas que las células presentan cuando se encuentran adheridas al andamio. El homodímero de etídio emite fluorescencia roja cuando reacciona con los ácidos nucleicos de las células que tienen dañada su membrana plasmática (células muertas). Por otro lado, el derivado acetometoxi de la calceína (calceína-AM) es permeable a la membrana celular de las células vivas y una vez dentro de ellas, las esterasas intracelulares eliminan el grupo AM y la calceína emite fluorescencia verde [124]. Como las células muertas carecen de esterasas activas, solo las células vivas presentan esta propiedad.

En la Figura 3.18 se muestra la monocapa de condrocitos formada sobre la superficie de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV tras 10 días de cultivo *in vitro*, en ella se pueden apreciar a las células vivas emitiendo fluorescencia verde, mientras que las células muertas emiten fluorescencia en rojo.





*Figura 3.18: Micrografía fluorescente de los constructos sometidos a la prueba de viabilidad celular mediante calceína-AM y homodimero de etidio tras 10 días de cultivo in vitro. Se observan en verde los condrocitos auriculares vivos y en rojo los muertos. Alrededor del >99% de las células sobre el hidrogel de CS/PVA/ECH UV se encuentran vivas.*

El porcentaje de viabilidad sobre los hidrogeles se obtuvo comparando la cantidad de células vivas en relación con la cantidad de células muertas, siendo la viabilidad superior al 99%.

Conforme a los resultados de ESEM y viabilidad celular, es posible estipular que las membranas de CS/PVA/ECH UV proveen un ambiente óptimo para la adhesión, disseminación y viabilidad celular en el cultivo de condrocitos auriculares.

### **3.9 Prueba de citotoxicidad**

Para determinar el posible efecto citotóxico de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV sobre los condrocitos sembrados en él, se realizaron pruebas de MTT. La prueba de MTT, indica el estado del metabolismo de las células mediante el cambio de color de las sales de tetrazolio al ser reducidas a formazán cuando son incubadas con células viables [139]. Así, el ensayo únicamente detecta células vivas y la intensidad de la señal generada depende de su grado de activación. En otras

palabras, la absorbancia del formazán producido refleja el nivel de metabolismo celular como función del tiempo de cultivo de las células sobre un sustrato.

En la Figura 3.19, se muestra la gráfica correspondiente a la absorbancia a 620 nm del formazán producido por los condrocitos en los constructos, por el control positivo (condrocitos en pozo de cultivo) y por el control negativo (hidrogeles de CS/PVA/ECH UV) durante los primeros 10 días de cultivo *in vitro*.

Los resultados muestran que con el transcurso de los días hay un incremento gradual en la absorbancia tanto de los constructos como de los condrocitos en el pozo de cultivo. Este incremento en la absorbancia se debe a una mayor producción de formazán como resultado de la proliferación de los condrocitos. De esta manera, un incremento en la absorbancia hace referencia a un incremento en la actividad metabólica y por lo tanto indirectamente señala un incremento en la viabilidad celular [124].

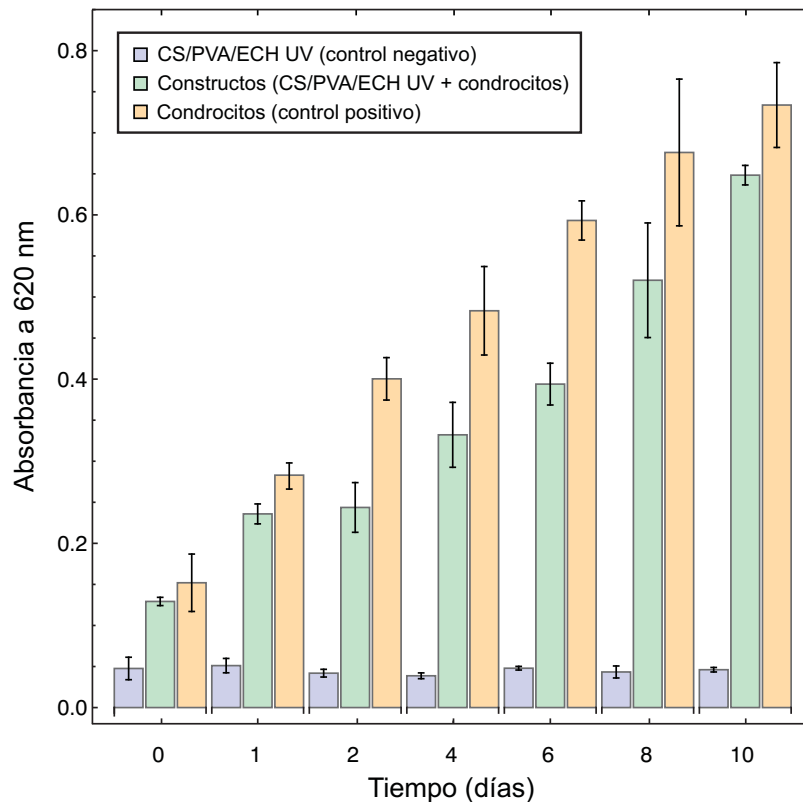


Figura 3.19: Absorbancia en función de la citotoxicidad durante los primeros 10 días de cultivo *in vitro*. En esta figura las barras azules representan a los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV sin células (control negativo); las barras amarillas a los condrocitos sobre las cajas de poliestireno (control positivo) y las barras verdes corresponden a los constructos formados con membranas de CS/PVA/ECH UV y condrocitos.

A pesar de que a partir del segundo día hay una diferencia mayor entre la absorbancia de los constructos y la absorbancia del control positivo, ambos siguen la misma tendencia durante todo el periodo de cultivo.

Así, debido a que la absorbancia de los constructos incrementa a lo largo de toda la prueba, es posible establecer que no existe un efecto citotóxico durante los primeros 10 días de cultivo *in vitro*, por lo cual, los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV pueden ser considerados potencialmente como andamios celulares en la regeneración de tejidos, concretamente, para su uso en la regeneración de cartílago elástico auricular.

Otro parámetro que puede ser determinado mediante las pruebas de citotoxicidad, es la evaluación del estado de proliferación celular, es decir, la capacidad de las células para dividirse y propagarse [124]. El conocimiento de este parámetro es importante debido a que los biomateriales que pretendan ser usados para aplicaciones en ingeniería de tejidos, no solamente deben ser citocompatibles y servir como apoyo en la adhesión celular, si no que también deberán promover la proliferación de las células adheridas a ellos [101].

El método más directo para obtener información acerca de la proliferación consiste en cuantificar el número de células presentes sobre el sustrato. Así, con la finalidad de obtener una ecuación que relacione de manera directa la absorbancia leída por el espectrofotómetro con el número de células viables presentes (i.e. células capaces de sintetizar formazán), se realizó la calibración del espectrofotómetro respecto a un número conocido de células.

En la Figura 3.20 se muestra la gráfica que se obtuvo durante la calibración del espectrofotómetro Beckman Coulter empleado en las pruebas de MTT. A partir de los datos experimentales registrados (Figura 3.20, puntos) se realizó un ajuste en el software Mathematica para obtener el modelo que mejor describa la relación entre el número de células presentes y la absorbancia de formazán a 620 nm. De esta manera, la función logarítmica  $y = -1.356 + 0.176 \log x$  (Figura 3.20, línea intermitente) describe la dependencia de la absorbancia leída por el equipo respecto al número de células viables presentes en el cultivo.

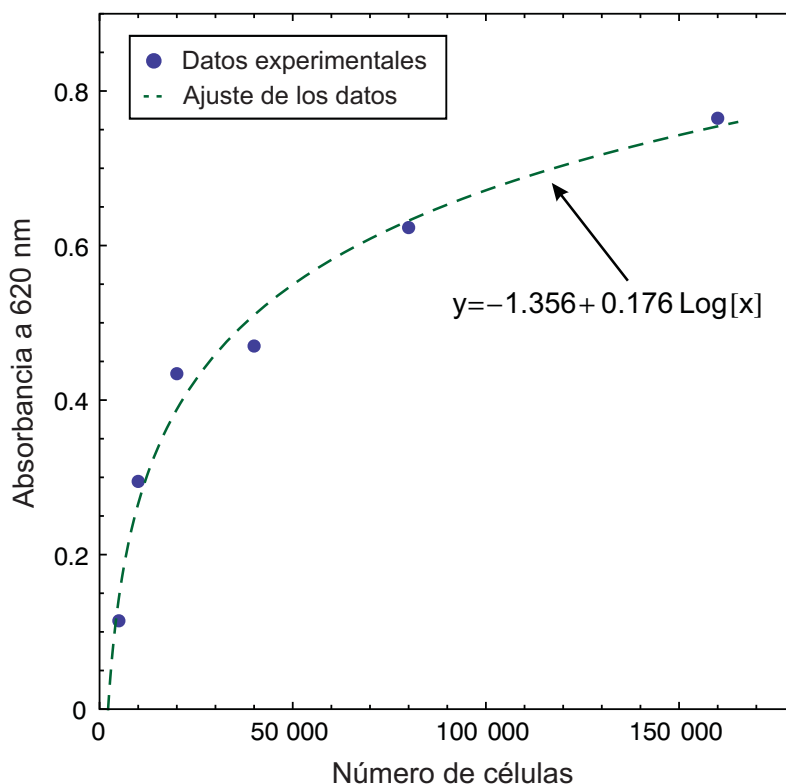


Figura 3.20: Calibración del espectrofotómetro respecto a un número de células conocido. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea discontinua al ajuste matemático que describe la relación entre la absorbancia leída y el número de células viables.

Al aplicar la función logarítmica sobre los resultados de las pruebas de MTT (Figura 3.19), es posible generar un gráfico de proliferación celular como el mostrado en la Figura 3.21.

Como se puede observar en la gráfica (Figura 3.21), la proliferación celular de los condrocitos pertenecientes al grupo control es mayor a la de los condrocitos adheridos a los constructos; sin embargo, este resultado era de esperarse pues a diferencia de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV usados como andamios, los pozos de cultivo sobre los cuales se encuentran los condrocitos del grupo control presentan un tratamiento de fabrica para promover la adhesión y proliferación celular. No obstante este resultado, los constructos siguen la misma tendencia de proliferación que el grupo control.

De acuerdo con el análisis realizado, los condrocitos presentes en los constructos se replican de manera exponencial conforme el tiempo de cultivo incrementa (Figura 3.21, línea discontinua). Dicho comportamiento coincide con el

reportado en la literatura para cultivos celulares en proliferación [140, 141]. Siguiendo este comportamiento, los constructos presentan una fase de latencia, una fase de aceleración y una fase de crecimiento exponencial.

En la fase de latencia, los condrocitos recién sembrados sobre las membranas de CS/PVA/ECH UV se encuentran en un periodo de adaptación al nuevo sustrato, por lo cual su proliferación no comienza de inmediato y el número de células se mantiene prácticamente constante. En esta fase, no hay gran actividad metabólica y las células únicamente sintetizan las enzimas y las moléculas necesarias para adherirse a los hidrogeles y comenzar a replicarse. En nuestras membranas dicha fase tuvo una duración de dos días (Figura 3.21). La duración de la fase de latencia puede corroborarse con el gráfico de MTT (Figura 3.19), ya que los días 1 y 2 no muestran un incremento significativo en absorbancia.

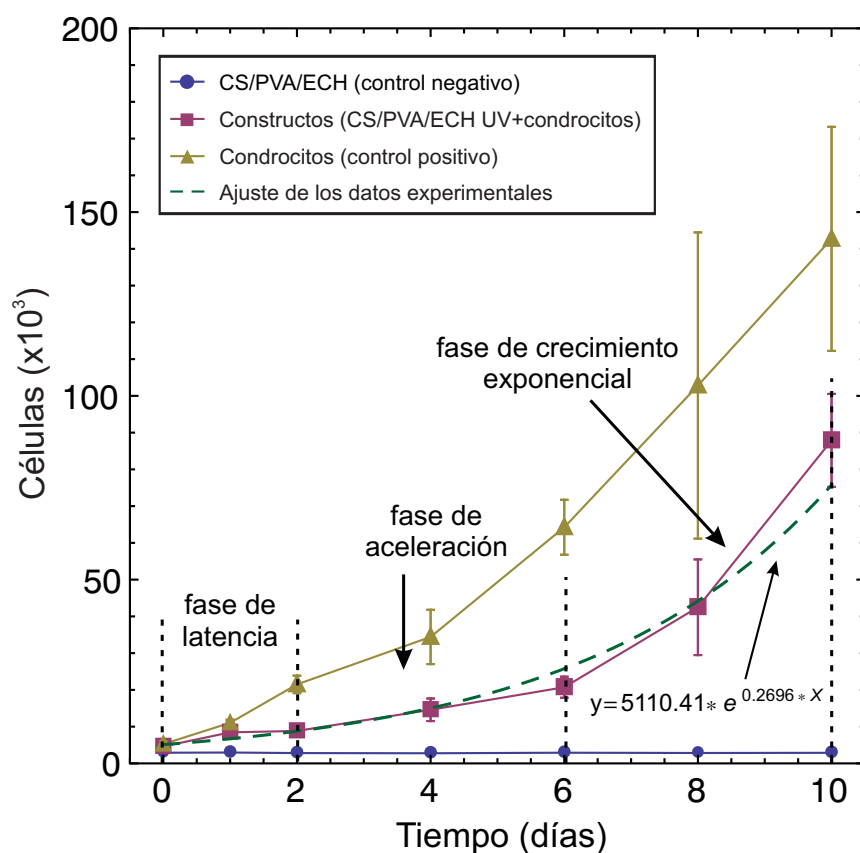


Figura 3.21: Gráfica de proliferación celular de los constructos (cuadrados) y de los controles negativos y positivos (círculos y triángulos, respectivamente) ensayados. Asimismo se señalan las fases de latencia, aceleración y crecimiento exponencial que siguen los constructos durante su proliferación (cuadrados).

Posterior al periodo de latencia, los constructos presentaron una fase de aceleración (días 2 - 6 de cultivo *in vitro*) durante la cual los condrocitos mejor adaptados comenzaron a replicarse lentamente (Figura 3.21).

En los días 8 y 10 de cultivo *in vitro*, los constructos presentan la fase de crecimiento exponencial, la cual, como se puede apreciar en la Figura 3.21, se caracteriza por un marcado incremento en el número de células; dicho incremento es de alrededor del doble del número de células presentes al final de la fase de aceleración [141]. Como se puede observar en la Figura 3.19, la actividad metabólica en los días 8 y 10 es máxima como resultados de la aceleración en la proliferación celular.

Es importante resaltar que la proliferación de los condrocitos del control positivo (Figura 3.21, triángulos) únicamente presenta dos fases de crecimiento: la fase de aceleración (día 1) y la de crecimiento exponencial (días 2 - 10). La ausencia de la fase de latencia en este grupo se debe a que los pozos de cultivo empleados cuentan con un tratamiento para promover la adhesión y proliferación celular, por lo cual, los condrocitos no necesitan sintetizar en un principio las moléculas y enzimas para adherirse al sustrato, pudiendo comenzar a proliferar de forma prácticamente inmediata.

En la Figura 3.22 se muestra la gráfica correspondiente a la velocidad de proliferación celular de los constructos y de los grupos de control (positivo y negativo) durante el periodo de cultivo *in vitro*.

En esta gráfica, también es posible identificar las fases del crecimiento celular presentadas por los constructos: la caída en la velocidad de proliferación corresponde a la fase de adaptación celular; el ligero incremento en la velocidad de crecimiento celular (~400 células/día) se asocia a la fase de aceleración y finalmente la fase de crecimiento exponencial corresponde al periodo en el que la velocidad de crecimiento es máxima (~3000 células/día).

Conforme a los resultados obtenidos en esta sección, es posible asegurar la viabilidad y la proliferación de los condrocitos sobre los hidrogeles de CS/PVA/ECH, por lo cual la citotoxicidad de los materiales queda descartada.

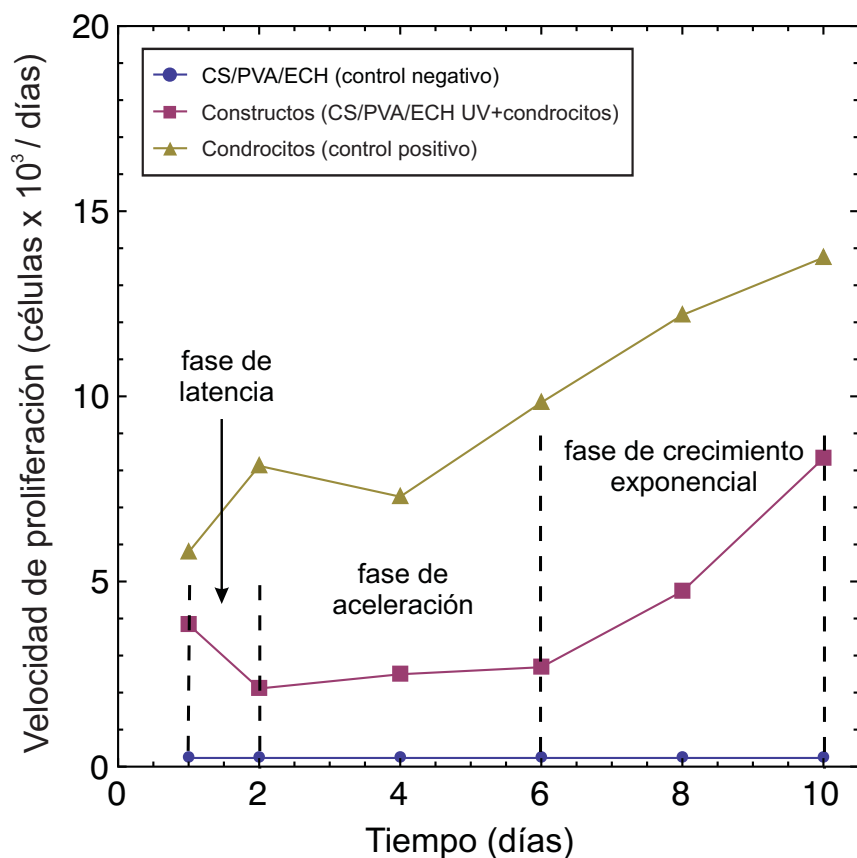


Figura 3.22: Velocidad de proliferación celular de los constructos (cuadrados) y de los controles negativos y positivos (círculos y triángulos, respectivamente) ensayados. Las fases de proliferación que presentan los constructos (fase de latencia, fase de aceleración y fase de crecimiento exponencial) son señaladas.

Los resultados de MTT refuerzan los obtenidos por  $^1\text{H}$  RMN, en los cuales no se encontraron trazas de ECH en las membranas. Lo anterior indica que la ECH, reaccionó por completo con las cadenas poliméricas de CS y PVA y por lo tanto cualquier posibilidad de liberación de ECH durante el cultivo celular quedó descartado. Así, siguiendo nuestra metodología, el uso de ECH como agente entrecruzante es inofensivo para las células en cultivo.

Todos los resultados obtenidos durante la caracterización biológica de los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV, demuestran que los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV pueden ser considerados para su uso potencial como andamios celulares en la regeneración de cartílago elástico.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONCLUSIONES**

En este estudio, fue posible medir y calcular las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles de CS/PVA/ECH usando la metodología aquí propuesta. Mediante la combinación de teorías ya establecidas como la teoría de los elastómeros, la termodinámica clásica y la teoría de la red polimérica se realizó la caracterización estructural de los hidrogeles usando una simple prueba de tensión uniaxial.

Las propiedades mecánicas, como la razón de elongación y el módulo elástico, presentan una alta dependencia de la estructura microscópica de la red polimérica; la cual, es definida por el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento, el tamaño de malla y la fracción volumétrica del polímero hinchado hasta su equilibrio. El módulo elástico promedio para los hidrogeles de CS/PVA/ECH fue de  $9 \pm 1$  MPa, mientras que los hidrogeles de CS/PVA/ECH UV mostraron un pequeño incremento en esta propiedad ( $11.5 \pm 2$  MPa). Los hidrogeles de CS/PVA/ECH (con y sin UV) presentan un módulo elástico similar al reportado para el cartílago auricular humano (5.11 - 12.2 MPa).

El proceso de esterilización de los hidrogeles mediante radiación UV propició un entrecruzamiento adicional en la red polimérica de los materiales. Dicho entrecruzamiento generó ligeras diferencias en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y estructurales de los hidrogeles. Respecto a las membranas de CS/PVA/ECH sin esterilizar, las membranas esterilizadas (CS/PVA/ECH UV) presentaron: menor porcentaje de hinchamiento al equilibrio (148 % vs. 156%), menor porcentaje de cristalinidad (8.1 % vs. 8.7%), mayor módulo elástico (11.5 MPa vs. 9 MPa), menor  $M_{crl}$  ( $31.71 \text{ g mol}^{-1}$  vs.  $39.08 \text{ g mol}^{-1}$ ) y mayor densidad de entrecruzamiento ( $1556.21 \text{ mol m}^{-3}$  vs.  $1241.23 \text{ mol m}^{-3}$ ).

A partir de los resultados de las pruebas biológicas, fue posible probar la biocompatibilidad de los hidrogeles. Así, la citotoxicidad de los materiales se descartó



a través de la prueba de MTT; mediante ESEM se comprobó la adhesión celular y usando calceína-AM y homodímero de etidio se determinó la viabilidad de las células adheridas a los hidrogeles. Adicionalmente, los resultados de MTT permitieron determinar la velocidad de proliferación celular de los condrocitos sembrados sobre las membranas. De este modo, los condrocitos presentaron todas las fases de crecimiento celular características de los tejidos en crecimiento (fase de latencia, fase de aceleración y fase de crecimiento exponencial).

En resumen, las membranas de CS/PVA/ECH tienen un gran potencial para aplicaciones en ingeniería de tejidos, siendo una de las principales su empleo como andamio celular en la regeneración de cartílago elástico para la reconstrucción del pabellón auricular micrótico.

Finalmente, como trabajo a futuro se propone estudiar los hidrogeles de CS/PVA/ECH mediante  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN (resonancia magnética nuclear de protones y de carbono, respectivamente) con la finalidad de corroborar la estructura molecular propuesta para la red polimérica, a través de la correlación homonuclear y heteronuclear de los espectros de resonancia que se obtengan.

Además, sería interesante realizar la caracterización mecánica de los constructos una vez concluido el periodo de cultivo *in vitro*. Ello con el propósito de determinar los posibles cambios en las propiedades mecánicas iniciales de los andamios y la contribución de la MEC sintetizada por las células a la resistencia mecánica del nuevo cartílago.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Transplantation USO. OPTN & SRTR annual report. 2011.
- [2] Billiet T, Vandenhoute M, Schelfhout J, Vlierberghe SV, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33:6020-41.
- [3] Peltola SM, Melchels FPW, D.W. G, M. K. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann Med* 2008;40:268-80.
- [4] Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol* 2004;22:643-52.
- [5] Nguyen DT, McCanless JD, Mecwan MM, Noblett AP, Haggard WO, Smith RA, et al. Balancing mechanical strength with bioactivity in chitosan–calcium phosphate 3D microsphere scaffolds for bone tissue engineering: air- vs. freeze-drying processes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2012:1-13.
- [6] Stammen JA, Williams S, Ku DN, Guldberg RE. Mechanical properties of a novel PVA in shear and unconfined compression. *Biomaterials* 2001:799-806.
- [7] Thomas LV, Arun U, Remya S, Nair PD. A biodegradable and biocompatible PVA-citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2009:S259-S69.
- [8] Bansal V, Sharma PK, Sharma N, Pal OP, Malviya R. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research* 2011;5:28-37.
- [9] Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res Part B* 2011:1451-7.
- [10] El-Hefian EA, Nasef MM, Yahaya AH. The Preparation and Characterization of Chitosan / Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films. *E-Journal of Chemistry* 2010;7:1212-9.
- [11] Azevedo EP, Retarekar R, Raghavan ML, Kumar V. Mechanical properties of cellulose: chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2011:1-14.
- [12] Borzacchiello A, Ambrosio L, Netti PA, Nicolais L, Peniche C, Gallardo A, et al. Chitosan-based hydrogels: Synthesis and characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2001;12:861-4.
- [13] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolimer for orthopedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005:5983-90.

- [14] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003;24:2339-49.
- [15] Zhong X, Ji C, Chan AK, Kazarian SG, Ruys A, Dehghani F. Fabrication of chitosan/poly(E-caprolactone) composite hydrogels for tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:279-88.
- [16] El-Hefian EA, Nasef MM, Yahaya AH. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blended films: Mechanical, thermal and surface investigations. *E-Journal of Chemistry* 2011;8:91-6.
- [17] Zhuang PY, Li YL, Fan L, Lin J, Hu QL. Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012;50:658-63.
- [18] He Z, Xiong L. Evaluation of physical and biological properties of polyvinyl alcohol/chitosan blend films. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* 2012;51:1705-14.
- [19] Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, et al. Development of polyvinyl alcohol bioartificial pancreas with rat islets and mesenchymal stem cells. *Transpl Proc* 2013;45:1875-80.
- [20] Abdelaal MY, Abdel-Razik EA, Abdel-Bary EM, El-Sherbiny IM. Chitosan-based interpolymeric pH-responsive hydrogels for in vitro drug release. *Journal of Applied Polymer Science* 2007;103:2864-74.
- [21] Zu Y, Zhang Y, Zhao X, Shan C, Zu S, Wang K, et al. Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012;50:82-7.
- [22] Islam A, Yasin T. Controlled delivery of drug from pH sensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend. *Carbohydrate Polymers* 2012;88:1055-60.
- [23] Mathews DT, Birney YA, Cahill PA, McGuinness GB. Mechanical and morphological characteristics of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* 2008;109:1129-37.
- [24] Costa-Junior ES, Barbosa-Stancioli EF, Mansur AAP, Vasconcelos WL, Mansur HS. Preparation and characterization of chitosan/PVA chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 2009;76:472-81.
- [25] Costa-Junior ES, Pereira MM, H.S. M. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:553-61.

- [26] Mansur HS, Costa-Junior ES, Mansur AAP, Barbosa-Stancioli EF. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels *Materials Science and Engineering C* 2009;29:1574-83.
- [27] Park H, Kim D. Swelling and mechanical properties of glycol chitosan/poly(vinyl alcohol) IPN-type superporous hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A* 2006;78:662-7.
- [28] Hu H, Xin JH, Hu H, Chan A, He L. Glutaraldehyde-chitosan and poly (vinyl alcohol) blends, and fluorescence of their nano-silica composite films. *Carbohydrate Polymers* 2013;91:305-13.
- [29] Bo J. Study on PVA hydrogel crosslinked by epichlorohydrin. *Journal of Applied Polymer Science* 1992;46:783-6.
- [30] Schmedlen RH, Masters KS, West JL. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23:4325-32.
- [31] Bahrami SB, Kordestani SS, Mirzadeh H, Mansoori P. Poly (vinyl alcohol)-chitosan blends: Preparation, mechanical and physical properties. *Iranian Polymer Journal (English Edition)* 2003;12:139-46.
- [32] Bispo VM, Mansur AAP, Barbosa-Stancioli EF, Mansur HS. Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2010;6:166-75.
- [33] Austero MS, Donius AE, Wegst UGK, Schauer CL. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis. *Journal of the Royal Society Interface* 2012;9:2551-62.
- [34] Donius AE, Kiechel MA, Schauer CL, Wegst UGK. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. Part II: mechanical properties. *J R Soc Interface* 2013.
- [35] Anseth KS, Bowman CN, Brannon-Peppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 1996;17:1647-57.
- [36] Treloar LRG. *The Physics of Rubber Elasticity*. New York: Oxford University Press; 2005.
- [37] Gutiérrez G. *Principios de Anatomía Fisiología e Higiene*. México: Limusa; 2004.
- [38] Ross MH, Pawlina W. *Histology. A Text and Atlas with correlated cell and molecular biology*. E.E.U.U.: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- [39] Anatomía de la audición. In: oído Ad, editor. [http://files.gonzalo-del-rio.webnode.es/200000055-7749d7843d/oído\\_externo\\_medio\\_interno/qans.jpg2013](http://files.gonzalo-del-rio.webnode.es/200000055-7749d7843d/oído_externo_medio_interno/qans.jpg2013).

- [40] Ruszymah BHI, Lokman BS, Asma A, Munirah S, Chua K, Mazlyzam AL, et al. Pediatric auricular chondrocytes gene expression analysis in monolayer culture and engineered elastic cartilage. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2007;71:1225-34.
- [41] Estructura del pabellón auricular. In: auricular P, editor. [http://2.bp.blogspot.com/\\_3CV8SXd7-xY/Sed3ApTedbl/AAAAAAAAAHmw/9X5z-KVCafc/s400/otitis\\_oido\\_anatomia.jpg2013](http://2.bp.blogspot.com/_3CV8SXd7-xY/Sed3ApTedbl/AAAAAAAAAHmw/9X5z-KVCafc/s400/otitis_oido_anatomia.jpg2013).
- [42] Luna Reyes FA. Guía Clínica de Malformaciones de Oído Externo, Medio e Interno. México: Instituto Nacional de Rehabilitación; 2012. p. 22.
- [43] Reconstrucción Auricular. Guías de Diagnóstico de Cirugía Plástica y Reconstructiva México: Hospital General de México "Dr. Manuel Gea González"; 2012. p. 4.
- [44] Anotia y microtia. In: Anotia, editor. [http://infogen.org.mx/wp-content/uploads/2013/08/Microtia\\_clip\\_image004.jpg2010](http://infogen.org.mx/wp-content/uploads/2013/08/Microtia_clip_image004.jpg2010).
- [45] Dahl JP, Caballero M, Pappa AK, Madan G, Shockley WW, Van Aalst JA. Analysis of human auricular cartilage to guide tissue-engineered nanofiber-based chondrogenesis: Implications for microtia reconstruction. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2011;145:915-23.
- [46] Bichara DA, O'Sullivan NA, Pomerantseva I, Zhao X, Sundback CA, Vacanti JP, et al. The tissue-engineered auricle: Past, present, and future. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 2012;18:51-61.
- [47] Tanzer RC. Total reconstruction of the auricle: a 10 year report. *Plast Reconstr Surg* 1967;40:547-50.
- [48] Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2004;25.
- [49] Reiffel AJ, Kafka C, Hernandez KA, Popa S, PErez JL, Zhou S, et al. High-fidelity tissue engineering of patient-specific auricles for reconstruction of pediatric microtia and other auricular deformities. *PLoS ONE* 2013;8:e56506.
- [50] Cho BC, Kim JY, Byun JS. Two-stage reconstruction of the auricle in congenital microtia using autogenous costal cartilage. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2007;60:998-1006.
- [51] Sterodimas A, de Faria J, Correa WE, Pitanguy I. Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2009;62:447-52.

- [52] Williams JD, Romo TI, Sclafani AP, Cho H. Porous highdensity polyethylene implants in auricular reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:578-83.
- [53] Havla JB, Lotz AS, Richter E, Froelich K, Hagen R, Staudenmaier R, et al. Cartilage tissue engineering for auricular reconstruction: In vitro evaluation of potential genotoxic and cytotoxic effects of scaffold materials. *Toxicology in Vitro* 2010;24:849-53.
- [54] Nimeskern L, Martínez Ávila H, Sundberg J, Gatenholm P, Müller R, Stok KS. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2013;22:12-21.
- [55] Hoshi K, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Sakamoto T, et al. Recent trends in cartilage regenerative medicine and its application to oral and maxillofacial surgery. *Oral Science International* 2013;10:15-9.
- [56] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24:4337-51.
- [57] Pei Y, Wang X, Huang W, Liu P, Zhang L. Cellulose-based hydrogels with excellent microstructural replication ability and cytocompatibility for microfluidic devices. *Cellulose* 2013;20:1897-909.
- [58] Borzacchiello A, Ambrosio L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In: Barbucci R, editor. *Hydrogels: Biological Properties and Applications*. Milan: Springer-Verlag; 2009. p. 9-20.
- [59] Li J. Polymeric Hydrogels. In: Hin TS, editor. *Engineering Materials for Biomedical Applications*. UK: World Scientific Publishing Co; 2004. p. 7-1 - 7-18.
- [60] Omidian H, Park K. Introduction to Hydrogels. In: Ottenbrite RM, editor. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York: Springer Science; 2010. p. 1-16.
- [61] Chiellini F, Petrucci F, Ranucci E, Robberto S. Polymeric Hydrogels in drug release. In: Chiellini E, Sunamoto J, Migliaresi C, Ottenbrite RM, Cohn D, editors. *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics*. First ed. New York, USA: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 63-74.
- [62] Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* 2001;101:1869-79.
- [63] Sionkowska A. Natural Polymers as Components of Blends for Biomedical Applications. In: Dumitriu S, Popa V, editors. *Polymeric Biomaterials: Structure and Function*. 1 ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2013. p. 309-40.

- [64] Teng D. From chitin to chitosan. In: Yao K, Yao JL, Yin Y, editors. Chitosan Based Hydrogels: Functions and Applications. 1 ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2012. p. 1-38.
- [65] Nandagiri VK. Biomaterials of Natural Origin in Regenerative Medicine. In: Dumitriu S, Popa V, editors. Polymeric Biomaterials: Structure and Function. 1 ed. Boca Ratón, FL: CRC Press; 2013. p. 271-308.
- [66] Battaner AE. Biomoléculas, una introducción estructural a la Bioquímica. 1st ed. Salamanca, España: Ediciones Universidad Salamanca; 2012.
- [67] Mi FL, Tan YC, Liang HC, Huang RN, Sung HW. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2001;12:835-50.
- [68] Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* 2009;77:1-9.
- [69] Paradossi G. Hydrogels Formed by Cross-linked Poly(vinyl alcohol). In: Dumitriu S, Popa V, editors. Polymeric Biomaterials: Structure and Functions. 1 ed. Boca Ratón, FL: CRC Press; 2013. p. 37-56.
- [70] Lee SH, Park SM, Kim Y. Effect of the concentration of sodium acetate (SA) on crosslinking of chitosan fiber by epichlorohydrin (ECH) in a wet spinning system. *Carbohydrate Polymers* 2007;70:53-60.
- [71] Song Y, Li L, Zheng Q. Influence of epichlorohydrin modification on structure and properties of wheat gliadin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57:2295-301.
- [72] Nikolic G, Zlatkovic S, Cakic M, Cakic S, Lacnjevac C, Rajic Z. Fast Fourier Transform IR Characterization of Epoxy GY Systems Crosslinked with Aliphatic and Cycloaliphatic EH Polyamine Adducts. *Sensors* 2010;10:684-96.
- [73] Lee SH, Park SY, Choi JH. Fiber formation and physical properties of chitosan fiber crosslinked by epichlorohydrin in a wet spinning system: The effect of the concentration of the crosslinking agent epichlorohydrin. *Journal of Applied Polymer Science* 2004;92:2054-62.
- [74] Pública DGdS. Epiclorhidrina. Murcia, España: Servicio de Sanidad Ambiental; 2008. p. 15.
- [75] Vacanti CA, Cima LG, Ratkowski D, Upton J, Vacanti JP. Tissue engineered growth of new cartilage in shape of a human ear using synthetic polymers seeded with chondrocytes. *Mater Res Soc Symp Proc* 1992;252:367-74.

- [76] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997;100:297-304.
- [77] Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: Evaluation as an implant material. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1998;124:671-7.
- [78] Fussenegger M, Meinhart J, Höbling W, Kullich W, Funk S, Bernatzky G. Stabilized Autologous Fibrin-Chondrocyte Constructs for Cartilage Repair in Vivo. *Annals of Plastic Surgery* 2003;51:493-8.
- [79] Kamil SH, Kojima K, Vacanti MP, Bonassar LJ, Vacanti CA, Eavey RD. In vitro tissue engineering to generate a human-sized auricle and nasal tip. *Laryngoscope* 2003;113:90-4.
- [80] Park SS, Chi DH, Lee AS, Taylor SR, Iezzi JC. Biomechanical properties of tissue-engineered cartilage from human and rabbit chondrocytes. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2002;126:52-7.
- [81] Park SS, Jin HR, Chi DH, Taylor RS. Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocytes. *Biomaterials* 2004;25:2363-9.
- [82] Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T. Autologous Injectable Tissue-Engineered Cartilage by Using Platelet-Rich Plasma: Experimental Study in a Rabbit Model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007;65:1951-7.
- [83] Chetty A, Steynberg T, Moolman S, Nilen R, Joubert A, Richter W. Hydroxyapatite-coated polyurethane for auricular cartilage replacement: An in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2008;84:475-82.
- [84] Sterodimas A, De Faria J. Human auricular tissue engineering in an immunocompetent animal model. *Aesthetic Surgery Journal* 2013;33:283-9.
- [85] Hadlock TA, Vacanti JP, Cheney ML. Tissue engineering in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial Plastic Surgery* 1998;14:197-203.
- [86] Chang SCN, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ. Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2003;112:793-9.
- [87] Jeon O, Song SJ, Lee KJ, Park MH, Lee SH, Hahn SK, et al. Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities. *Carbohydrate Polymers* 2007;70:251-7.



- [88] Khurma JR, Rohindra DR, Nand AV. Synthesis and properties of hydrogels based on chitosan and poly(vinyl alcohol) crosslinked by genipin. *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry* 2006;43:749-58.
- [89] Rodrigues IR, de Camargo Forte MM, Azambuja DS, Castagno KRL. Synthesis and characterization of hybrid polymeric networks (HPN) based on polyvinyl alcohol/chitosan. *Reactive and Functional Polymers* 2007;67:708-15.
- [90] Alhosseini SN, Moztafzadeh F, Mozafari F, Asgari S, Dodel M, Samadikuchaksaraei A, et al. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int J Nanomed* 2012;7:25-34.
- [91] Islam A, Riaz M, Yasin T. Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013;59:119-24.
- [92] Pruitt LA, Chakravartula AM. Biocompatibility, Sterilization, and materials selection for implant design. In: Pruitt LA, Chakravartula AM, editors. *Mechanics of Biomaterials Fundamentals Principles for Omplant Design*. 1 ed. New York, USA: Cambridge; 2011. p. 3-25.
- [93] Dhawade PP, Jagtap RN. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research* 2012;3:1372-82.
- [94] Jin Y, Yang D, Zhou Y, Ma G, Nie J. Photocrosslinked electrospun chitosan-based biocompatible nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 2008;109:3337-43.
- [95] Sun SF. *Physical chemistry of macromolecules: basic principles an issues*. 1 ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 1994.
- [96] McBrierty VJ, Packer KJ. *Nuclear Magnetic Resonance in Solid Polymer*. New York, NY: Cambridge University Press; 2006.
- [97] Grupo de Síntesis Organica UJ. *Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear*. Castellón, España: Universidad Jaume I; 2011. p. 17.
- [98] *Resonancia Magnética Nuclear*. In: *energía Nd*, editor. <http://www.ugr.es/~quiorred/espec/rmn.htm>; Quiorred; 2013.
- [99] Cowie JMG, Arrighi V. *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*. 3 ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008.
- [100] Rubinson KA, Rubinson JF. *Análisis Instrumental*. DF, México: Pearson Education; 2001.

- [101] Zheng H, Du YM, Yu JH, Xiao L. The Properties and Preparation of Crosslinked Chitosan Films. *Kao Teng Hsueh Hsiao Hua Heush Hsueh Pao/ Chemical Journal of Chinese Universities* 2000;21:812.
- [102] Bunn CW. Crystal structure of polyvinyl alcohol. *Nature* 1948;161:929-30.
- [103] Hyon SH, Chu HD, Kitamaru R. Structure and Physico-Chemical Properties of Polyvinyl Alcohol, Stretched at the Amorphous State and Anneled. *Bull Inst Chem Res* 1975;53:367-80.
- [104] ASTM-International. ASTM D882/02: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. USA: ASTM; 2004.
- [105] ASTM-International. ASTM F2150/02: Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds used in tissue.engineered medical products. USA: ASTM; 2004.
- [106] Sánchez-Arévalo FM, Pulos G. Use of digital image correlation to determine the mechanical behavior of materials. *Mater Charact* 2008;59:1572-9.
- [107] Sánchez-Arévalo FM, Farfán M, Covarrubias D, Zenit R, Pulos G. The micromechanical behavior of lyophilized glutaraldehyde-treated bovine pericardium under uniaxial tension. *J Mech Behav Biomed* 2010;3:640-6.
- [108] Peppas NA, Merrill EW. Croslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *J Appl Polym Sci* 1977;21:1763-70.
- [109] Peppas NA, Mikos AG. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Ratón, FL: CRC Press; 1987.
- [110] D'Errico G, De Lellis M, Mangiapia G, Tedeschi A, Ortona O, Fusco S, et al. Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. *Biomacromolecules* 2008;9:231-40.
- [111] Garnica-Palafox IM, Sánchez-Arévalo FM, Velasquillo C, García-Carvajal ZY, García-López J, Ortega-Sánchez C, et al. Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2013.
- [112] Flory PJ. *Principles of polymer chemistry*. New York, USA: Cornell University Press; 1953.
- [113] Liu Y, Vrana NE, Cahill PA, McGuinness GB. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2009;90:492-502.

- [114] Neamark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Bunaprasert T, Supaphol P, Rujiravanit R. In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. *Carbohydrate Polymers* 2007;68:166-72.
- [115] Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews* 2004;104:6017-84.
- [116] Neckers DC, Doyle MP. *Química Orgánica*. 1ra ed. D.F., México: C.E.C.S.A.; 1980.
- [117] Jacob R, Tate M, Banti Y, Rix C, Mainwaring DE. Synthesis, characterization, and ab initio theoretical study of a molecularly imprinted polymer selective for biosensor materials. *Journal of Physical Chemistry A* 2008;112:322-31.
- [118] Gonçalves VL, Laranjeira MCM, Fávere VT. Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005;15:6-12.
- [119] Zhen H, Nie J, Sun J, Guo S, Yang D. Electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) blend ultrafine fibers and their ultraviolet photocrosslinking. *Acta Polymerica Sinica* 2007:230-4.
- [120] Hua S, Wang A. Synthesis, characterization and swelling behaviors of sodium alginate-g-poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent. *Carbohydrate Polymers* 2009;75:79-84.
- [121] Gunasekaran S, Tao W, Chunxiang C. Swelling of pH-sensitive chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* 2006;102:4665-71.
- [122] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57:35-52.
- [123] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57:19-34.
- [124] Narayan R. *Biomedical Materials*. New York, USA: Springer; 2009.
- [125] Chen GH, Wang FY, Mao CF, Yang CH. Studies of chitosan. I. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 2007;105:1086-92.
- [126] Ruiz J, Mantecón A, Cádiz V. Network characterization and swelling behavior of chemical hydrogels based on acid-containing poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science* 2003;88:3026-31.

- [127] Abdeen Z. Swelling and reswelling characteristics of cross-linked poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogel film. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2011;32:1337-44.
- [128] Li C, She M, She X, Dai J, Kong L. Functionalization of polyvinyl alcohol hydrogels with graphene oxide for potential dye removal. *Journal of Applied Polymer Science* 2014;131.
- [129] Mogilevskaya EL, Akopova TA, Zelenetskii AN, Ozerin AN. The crystal structure of chitin and chitosan. *Polym Sci Ser A* 2006;48:116-23.
- [130] Islam A, Yasin T, Rehman Iu. Synthesis of hybrid polymer networks of irradiated chitosan/poly(vinyl alcohol) for biomedical applications. *Radiation Physics and Chemistry* 2014;96:115-9.
- [131] Gent AN. *Engineering with rubber; how to design rubber components*. Munich: Hanser; 2001.
- [132] Li J, Suo J, Deng R. Structure, mechanical, and swelling behaviors of poly(vinyl alcohol)/SiO<sub>2</sub> hybrid membranes. *Journal of Reinforced Plastics and Composites* 2010;29:618-29.
- [133] Chen SH, Tsao CT, Chang CH, Lai YT, Wu MF, Liu ZW, et al. Synthesis and characterization of reinforced poly(ethylene glycol)/chitosan hydrogel as wound dressing materials. *Macromolecular Materials and Engineering* 2013;298:429-38.
- [134] Cauich-Rodriguez JV, Deb S, Smith R. Effect of cross-linking agents on the dynamic mechanical properties of hydrogel blends of poly(acrylic acid)/poly-(vinyl alcohol-vinyl acetate). *Biomaterials* 1996;17:2259-64.
- [135] Sanabria-DeLong N, Crosby AJ, Tew GN. Photo-cross-linked PLA-PEO-PLA hydrogels from self-assembled physical networks: Mechanical properties and influence of assumed constitutive relationships. *Biomacromolecules* 2008;9:2784-91.
- [136] Krishna L, Jayabalan M. Synthesis and characterization of biodegradable poly (ethylene glycol) and poly (caprolactone diol) end capped poly (propylene fumarate) cross linked amphiphilic hydrogel as tissue engineering scaffold material. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009;20:S115-S22.
- [137] McKenzie JL, Webster T. Protein Interactions at Material Surface. In: Narayan R, editor. *Biomedical Materials*. New York, NY: Springer Science; 2009. p. 215-38.
- [138] Castell ADeCB. *Cartílago. PÁGINA WEB INTERACTIVA DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR*. México: Facultad de Medicina de la UNAM; 2012.

- [139] Wang QG, Hughes N, Cartmell SH, Kuiper NJ. The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profiles. *European Cells and Materials* 2010;19:86-95.
- [140] Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Introducción a la microbiología*. 9 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
- [141] Gil-Loyzaga PE. *Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. 1 ed. Madrid: Vision Libros; 2011.